

Untersuchungen zur Steuerung
der Nitratassimilation
bei *Chlorella fusca*
auf der Stufe des Nitrits:
Beeinflussung durch Kohlenstoff-
und Schwefelversorgung

Elisabeth Krämer

Disbui. München

1988

Untersuchungen zur Steuerung
der Nitratassimilation
bei *Chlorella fusca*
auf der Stufe des Nitrits:
Beeinflussung durch
Kohlenstoff- und Schwefelversorgung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Elisabeth Krämer
aus Hamburg

März 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Schmidt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rau

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Mai 1988

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	Seite
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	7
2.1 Biologisches Material	7
2.1.1 Verwendete Organismen	7
2.1.2 Anzucht	7
2.1.3 Algenaufschluß	9
2.1.4 Envelope-Auftrennung	9
2.2 Geräte	10
2.3 Chemikalien	10
2.4 Methoden	11
2.4.1 Nachweisverfahren	11
2.4.1.1 Nitratbestimmung	11
2.4.1.2 Nitritbestimmung	11
2.4.1.3 Ammoniumbestimmung	11
2.4.1.4 Cysteinbestimmung	11
2.4.1.5 Bestimmung reduzierter Thiolgruppen	12
2.4.1.6 H ₂ S-Bestimmung	12
2.4.1.7 Proteinbestimmung	12
2.4.1.8 Stickoxid-Bestimmungen	12
2.4.2 Enzymmessungen	12
2.4.2.1 Nitratreduktase (E.C 1.6.6.1)	12
2.4.2.2 Nitritreduktase (E.C 1.7.7.1)	13
2.4.2.3 Glutaminsynthetase (E.C 6.3.1.2)	13
2.4.2.4 Thiosulfatreduktase (E.C 2.2.8.1)	14
2.4.3 Messung der membrankatalysierten Nitritreduktion	14

3	Ergebnisse	15
3.1	Langzeitversuche an <i>Chlorella</i> - Kulturen zur Abhängigkeit der Nitratassimilation von den Wachstumsbedingungen	15
3.1.1	Nitritausscheidung unter Kohlenstoffmangel-Bedingungen	15
3.1.1.1	Nitritausscheidung bei Luftbegasung	15
3.1.1.2	Nitrit- und Ammoniumexkretion bei Verringerung der CO ₂ -Konzentration	16
3.1.1.3	Lichtabhängigkeit der Nitritexkretion	17
3.1.1.4	Einfluß des pH-Wertes auf die Nitritausscheidung	19
3.1.1.5	Einfluß von Ammoniumzugabe auf die Nitritausscheidung	21
3.1.2	Nitritaufnahme bei hohem CO ₂ -Angebot	22
3.1.2.1	Erhöhung des CO ₂ -Partialdrucks nach Nitritexkretion	22
3.1.2.2	Zugabe von (Hydrogen-)Carbonat nach Nitritexkretion	23
3.1.2.3	Wirkung von Zuckerzugabe unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	24
3.1.2.4	Nitritzugabe zu langfristig CO ₂ -gesättigten Kulturen	26
3.1.3	Aufnahmeraten für verschiedene N-Salze in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen	27
3.1.3.1	Aufnahmeraten für jeweils einzeln vorliegende N-Salze	28
3.1.3.2	Aufnahmeraten bei gleichzeitigem Angebot mehrerer N-Verbindungen	28
3.1.4	Nitritausscheidung unter Schwefelmangel-Bedingungen	30
3.1.4.1	Nitritexkretion bei unterschiedlicher Sulfat-Ausgangskonzentration	30
3.1.4.2	Einfluß von Ammoniumzugabe auf die Nitritausscheidung	31
3.1.4.3	Nitritausscheidung bei Wachstum auf verschiedenen S-Quellen	31

3.1.5	Wirkung verschiedener S-Quellen auf die Nitrit- aufnahme	32
3.1.5.1	Sulfatzugabe	32
3.1.5.2	Zugabe verschiedener anorganischer und organi- scher S-Verbindungen	33
3.2	Enzymatische Untersuchungen	35
3.2.1	Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der C- Versorgung	35
3.2.1.1	Vergleich der Aktivitäten bei 5% und 0.035% CO ₂	35
3.2.1.2	Verlauf der Enzymaktivitäten nach Veränderung des CO ₂ -Partialdrucks	36
3.2.2	Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der S- Versorgung	40
3.2.2.1	Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Sul- fatkonzentration	40
3.2.2.2	Zeitlicher Verlauf der Nitritreduktase-Aktivität bei Sichtbar-Werden des S-Mangels	42
3.3	Untersuchung einer nitritbindenden Komponente an <i>Chlorella</i> - Membranen	43
3.3.1	Grundsätzliche Eigenschaften	43
3.3.1.1	Experimenteller Ansatz	44
3.3.1.2	pH-Abhängigkeit der Meßreaktion	45
3.3.1.3	Hemmstoffwirkung auf die membrankatalysierte Nitritreduktion	46
3.3.1.4	Abhängigkeit von der Nitritkonzentration	48
3.3.1.5	Lokalisation der nitritbindenden Membrankompo- nente	48
3.3.2	Metallkatalysierte Nitritreduktion	49
3.3.2.1	Untersuchung verschiedener Metalle	49
3.3.2.2	Eigenschaften der Eisen-katalysierten Nitritre- duktion	51
3.4	Abhängigkeit der membrankatalysierten Nitritre- duktion von den Wachstumsbedingungen	52
3.4.1.	Abhängigkeit von der C-Versorgung	53
3.4.1.1	Einfluß der CO ₂ -Konzentration	53

3.4.1.2	Verhalten der Reduktionsrate nach Veränderung der CO ₂ -Konzentration	54
3.4.2	Einfluß der S-Versorgung	55
3.4.2.1	Reduktionsraten bei unterschiedlicher Sulfatausgangskonzentration	55
3.4.2.2	Aktivitätsverlauf bei Eintreten des S-Mangels	56
3.4.3	Einfluß der N-Versorgung	57
3.4.3.1	Abhängigkeit von der Nitratausgangskonzentration	58
3.4.3.2	Aktivität in Ammonium-haltigem Medium	59
3.5	Versuche zum Nitritstoffwechsel bei <i>Synechococcus</i> 6301	60
3.5.1	Nitritausscheidung unter C-Mangel	60
3.5.1.1	Nitritausscheidung bei Luftbegasung	60
3.5.1.2	Einfluß des pH-Wertes auf die Nitritausscheidung	61
3.5.1.3	Einfluß von Ammoniumzugabe auf die Nitritausscheidung	62
3.5.2	Nitritaufnahme bei hohem CO ₂ -Angebot	63
3.5.2.1	Nitritaufnahme nach Erhöhung des CO ₂ -Partialdrucks	63
3.5.2.2	Nitritaufnahme bei langfristig hohem CO ₂ -Partialdruck	64
3.5.3	Nitritausscheidung bei S-Mangel	65
3.5.3.1	Wachstum in sulfatfreiem Medium	65
3.5.3.2	Einfluß von reduzierten N-Verbindungen auf die Nitritausscheidung	65
3.5.4	Nitritaufnahme bei verschiedenen S-Quellen	66
3.5.5	Untersuchung auf die nitritreduzierende Membrankomponente	68
3.5.5.1	Nachweis und grundsätzliche Eigenschaften	68
3.5.5.2	Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen	69

4	Diskussion	70
4.1	Nitritstoffwechsel bei <i>Chlorella</i> unter S-Mangel	71
4.2	Nitritstoffwechsel bei <i>Chlorella</i> unter Kohlenstoffmangel	75
4.3	Nitritstoffwechsel bei <i>Synechococcus</i>	93
4.4	Ausblick	95
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturverzeichnis	102

Abkürzungen

ADP	= Adenosin-5'-diphosphat
ATP	= Adenosin-5'-triphosphat
DTE	= Dithioerythrol
DTNB	= 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
EDTA	= Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz (Titriplex III)
FMN	= Flavinmononucleotid
GS	= Glutaminsynthetase
K _M	= Michaelis-Konstante
MOPSO	= 3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
MSX	= L-Methionin-DL-Sulfoximin
NAD (H)	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADP (H)	= Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NAR	= Nitratreduktase
NIR	= Nitritreduktase
POPSO	= Piperazin-N,N'-bis(2-hydroxypropansulfonsäure)
SHAM	= Salicylhydroxamsäure
TAPS	= N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfon- säure
TAPSO	= 3-[N-(Tris-hydroxymethyl)methylamino]-2-hydroxy- propansulfonsäure
Tris	= Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSR	= Thiosulfatreduktase

1 Einleitung

Die assimilatorische Nitratreduktion ist neben der CO_2 -Assimilation der zweite große photosynthetische Prozeß bei Pflanzen, soweit sie ihren Stickstoffbedarf nicht durch Symbiose mit N_2 -Fixierern aus der Luft decken können. Durch die Nitratassimilation werden jährlich schätzungsweise $2 \cdot 10^4$ Megatonnen anorganischen Stickstoffs reduziert; der Elektronenbedarf der Nitratreduktion aus der Photosynthese beträgt etwa ein Fünftel des Wertes für die CO_2 -Assimilation (61,103). Entsprechend ihrer mengenmäßigen Bedeutung gibt es vielfältige Untersuchungen zur Enzymatik der Nitratreduktion und ihrer Regulation, sowohl bei höheren Pflanzen als auch bei Algen.

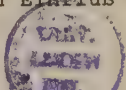
Die Enzyme der Nitratassimilation sind auf 2 Kompartimente verteilt: Die Nitratreduktion selbst läuft wahrscheinlich im Cytoplasma ab (103). Die Nitratreduktase ist ein Molybdän-haltiges Flavoprotein, das NAD(P)H_2 als Elektronendonator benötigt (61) und die Elektronen von dort über eine intramolekulare Redoxkette, die u.a. den Molybdän-Cofaktor umfaßt, weiterleitet (61,84,103).

Die weiteren Teilschritte der Assimilation laufen im Chloroplasten ab (61,103,106,135): die Reduktion von Nitrit zu Ammonium durch die Nitritreduktase mit Hilfe von reduziertem Ferredoxin (72,135) und der Einbau des entstandenen Ammoniums zunächst mit der ATP-abhängigen Glutaminsynthetase (34,55,101) in Glutamin und von dort durch die - wiederum Ferredoxin-abhängige - Glutamatsynthase (34,118) in Glutamat.

Für die Regulation der Stickstoffassimilation werden 2 Komplexe als bedeutend angesehen (10,14,35):

1. die eigentliche Nitratreduktion
2. die Ammoniumassimilation durch die Enzyme Glutaminsynthetase/Glutamatsynthase.

Die langfristige Regulation der Nitratreduktase erfolgt auf der Ebene des Enzymgehalts: Es liegen Daten zur Reprimierung durch Ammonium vor (31,61) und zur Induktion durch Nitrat (41,91,134,166) und Licht (41,62,134,148). Der Befund der Nitratinduktion ist nicht unumstritten; auf jeden Fall besitzt Nitrat aber einen stimulierenden Einfluß auf die Enzymsynthese (61).



Außerdem scheinen noch andere Faktoren eine Rolle zu spielen. So muß ein plastidäres Signal Abstimmung mit der Chloroplasten-Aktivität gewährleisten (18,134): Denn einerseits laufen die Folgeschritte der Nitratassimilation in den Plastiden ab, andererseits stammen zumindest in grünen Zellen auch die Reduktionsäquivalente für die Nitratreduktion aus der Photosynthese (97,100). Denn wenn diese Zellen ihren Energiebedarf über die Atmung decken müssen, ist die Konkurrenz der Atmungskette um NADH_2 offensichtlich zu groß, als daß dieses für die Nitratreduktion zur Verfügung stünde (148). Auch Phytochrom (134,136) und Kinetin (136) sollen an der Enzyminduktion - und auch der Feinregulation (41) - beteiligt sein.

Daneben gibt es eine Vielzahl von Faktoren (61), die die Enzymaktivität reversibel modulieren. Außer einer Hemmung durch Ammonium (31,104,127) ist u.a. die inaktivierende Wirkung von reduzierenden Bedingungen in Abwesenheit des Substrats Nitrat bekannt (40,102,152). Die Reaktivierung kann sowohl in vitro als auch in vivo durch Oxidation erfolgen (11,152). Vermittelt durch Flavine (6) wirkt auch die beobachtete Blaulichtaktivierung möglicherweise über Oxidation des Enzymmoleküls (6,7,11).

Bei Algen - und möglicherweise auch bei höheren Pflanzen - wird die Aktivität der Nitratreduktase im wesentlichen nicht am Enzymmolekül selbst sondern durch das Substratangebot verändert (50,98,130,166). Obwohl manche (vakuoläre) Algen und höhere Pflanzen einen verhältnismäßig großen Nitratpool besitzen, scheint der größtenteils in der Vakuole zu liegen und metabolisch nicht verfügbar zu sein (61,163). Den eigentlich regulierten Schritt stellt daher die Nitrataufnahme dar, die ATP-abhängig ist und über einen Nitratcarrier erfolgt (61). Dieser Carrier wird - neben Licht und Kohlendioxid - über das Angebot an reduziertem Stickstoff gesteuert (50,166). Versuche mit dem Glutaminsynthetase-Hemmstoff L-Methionin-DL-Sulfoximin (MSX) machen wahrscheinlich, daß die regulierende Funktion dabei nicht durch Ammonium selbst sondern durch einen organischen Metaboliten ausgeübt wird (52,122,141). Damit ist die Regulation abhängig von aktivem C-Stoffwechsel. Neben der Hemmung des Nitratcarriers wurde in Gegenwart von Ammonium beschleunigter Nitrat-Efflux beobachtet (37,38).

Die Ammoniummetabolisierung durch Glutaminsynthetase und Glutamatsynthase stellt einen eigens regulierten Schritt dar (35). Das ist vor allem deswegen nötig, weil ein wesentlicher Teil des anfallenden Ammoniums nicht aus der Nitratreduktion sondern aus der Photorespiration stammt (30,93). Für Algen ist u.a. eine Regulation der Glutaminsynthetase durch die vorliegende Glutaminkonzentration (139) und Lichtregulation über Thioredoxine bekannt (168,169).

Im Vergleich zu den beiden im Stoffwechsel angrenzenden Schritten liegen zur Nitritreduktion verhältnismäßig wenig Ergebnisse vor. Seit frühen Untersuchungen von Kessler (89) und Davis (36) war bekannt, daß die Nitritreduktion der Pflanzen ein photosynthetischer Schritt ist. Die genauere Untersuchung dieser Reaktion wurde jedoch durch die Tatsache erschwert, daß in Zellextrakten Nitritreduktion auch mit NADPH_2 als Elektronendonator erfolgen kann (65,91) - nachträglich erklärbar durch die Anwesenheit von Ferredoxin-NADP-Reduktase (135). Deshalb wurde die Nitritreduktase lange Zeit für ein NADP-abhängiges Flavoprotein gehalten, und auch die lichtabhängige Reduktion wurde indirekt über die Bildung von NADPH_2 erklärt (75,90). Außerdem ging man davon aus, daß - wie die Nitratreduktion - auch die Weiterreduktion des Nitrits zu Ammonium in 2-Elektronenschritten erfolgen müsse (90), so daß u.a. Hydroxylamin als Zwischenprodukt auftreten sollte. Inzwischen ist geklärt, daß die Nitritreduktion als 6-Elektronenschritt an einem Enzym, der Nitritreduktase, katalysiert wird (135). Ob dabei etwa Hydroxylamin als enzymgebundenes Intermediat auftritt, ist nicht entschieden (9).

Bei Aufreinigungsversuchen der Nitritreduktase stellte sich heraus, daß das eigentliche Enzym noch eine niedermolekulare Komponente für seine Aktivität benötigt, die dann als Ferredoxin identifiziert wurde (75,105,128). Schließlich wurde postuliert, daß Ferredoxin der eigentliche Elektronendonator der Nitritreduktion sei, unabhängig davon, ob es selbst aus dem photosynthetischen Elektronentransport, durch NADPH_2 oder die Hydrogenase-Reaktion reduziert wird (135). Gleichzeitig wurde auch die Lokalisation der Nitritreduktase in Chloroplasten beschrieben (135). In den folgenden Jahren wurde diese Lokali-

sation gelegentlich in Frage gestellt (103), gilt heute aber als gesichert (61,103,106).

Untersuchungen des aufgereinigten Enzyms ergaben, daß es als prosthetische Gruppen sowohl ein Sirohäm als auch ein Eisen-Schwefel-Zentrum enthält (175). Der bislang letzte neue Befund bezüglich der Enzymzusammensetzung ist der, daß die Nitritreduktase deutlich größer ist als vorher angenommen. Auf Grund von Enzymaufreinigungen ging man von einem Molekulargewicht unter 70 000 D aus (103,182). Jetzt wurde gefunden, daß zum Enzym noch eine kleinere Untereinheit gehört (etwa 25 000 D), die für die Ferredoxinbindung entscheidend ist (72,144) und die sich bei der Enzymisolierung leicht von der eigentlich katalytischen Untereinheit löst. Diese ist mit reduziertem Methylviologen, das für Routinemessungen meist als Ferredoxin-Ersatz verwendet wird, noch vollständig aktiv (72,144).

Die Synthese der Nitritreduktase erfolgt - wie auch die der anderen plastidären Enzyme aus der Nitratassimilation - an 80 S - Ribosomen, also im Cytoplasma (18,45,162). Als induzierend werden entweder Nitrat (62,85) oder Nitrit (79,165) oder beide Ionen angenommen. Die Regulation der Enzymsynthese scheint jedenfalls eng an die der Nitratreduktase gekoppelt zu sein (61,85,147); andererseits wurde das Enzym auch als konstitutiv beschrieben (91). Am fertigen Enzym wurde bei Gerste (12), aber nicht bei Spinat (131) und *Chlamydomonas* (31) Endprodukthemmung durch Ammonium gefunden. Wie auch für die Nitratreduktase liegen Daten zur Lichtaktivierung vor, die nicht über Thioredoxin erfolgt und für die es bisher keine befriedigende Erklärung gibt (26,77,142,162). Im allgemeinen geht man davon aus, daß die Nitritreduktase in großem Überschuß gegenüber der Nitratreduktase vorhanden ist, um ein Vorkommen höherer Konzentrationen ihres toxischen Substrats Nitrit zu verhindern (61,85,106,134). Die Aktivität der Nitritreduktase würde damit im wesentlichen vom Angebot an Nitrit, das durch die Nitratreduktase-Reaktion bereitgestellt wird, bestimmt. Hierbei bleibt allerdings die Frage offen, wie das Nitrit, das im Cytoplasma entsteht, tatsächlich zum Ort der Weiterreduktion im Chloroplasten gelangt. Oft wird der Transport durch die Chloroplastenhülle ausschließlich auf Diffusion (hauptsächlich der undissoziierten Säure

HNO₂) zurückgeführt (66). Gelegentlich wird aber auch aktiver Nitrittransport angenommen (73,142), ausgehend ursprünglich von der Beobachtung Kesslers, daß die Nitritreduktion energieabhängig ist (88,89,92). Eine Entscheidung darüber ist derzeit nicht möglich.

Von Kaiser und Heber (81) wurden die Permeabilitätskoeffizienten jeweils für das Nitritanion und die salpetrige Säure an isolierten Chloroplasten und an Protoplasten bestimmt. Die dabei gemessene wesentlich geringere Permeabilität des Plasmalemmas im Vergleich zum Envelope erklärt die Tatsache, daß Nitrit an Chloroplasten schon in viel geringeren Konzentrationen toxisch wirkt als an ganzen Zellen (81). Für den Transport über das Plasmalemma wird bei Algen und Wurzelzellen meist wiederum aktive Aufnahme angenommen (30,42), entweder über den Nitratcarrier (160) oder über ein eigenes Aufnahmesystem (21,31). In den letzten Jahren wurde aktive Nitritaufnahme auch bei Blaualgen beschrieben (53,108,155). Sie erfolgt hier wahrscheinlich nicht über einen speziellen Nitritcarrier sondern über den Nitratcarrier (108).

Beim Studium der photosynthetischen Nitritreduktion an Grünalgen zeigte sich, daß bei Kohlenstoffmangel - entsprechende Versuche wurden oft bei N₂-Begasung durchgeführt, um Interferenzen mit der CO₂-Assimilation ausschließen zu können - das aufgenommene Nitrat oft quantitativ als Nitrit und Ammonium ausgeschieden wird (97,110,171). Die Exkretion von Nitrit und/oder Ammonium wurde aber auch beobachtet, wenn in Kulturen Kohlenstofflimitierung durch Begasung mit Luft ohne Zusatz von CO₂ auftrat (7,42,172). Das Mengenverhältnis zwischen Nitrit- und Ammoniumausscheidung scheint nicht nur von der Vorbehandlung der untersuchten Algenkulturen und den genauen experimentellen Bedingungen abzuhängen, sondern es scheint sich außerdem zwischen verschiedenen Algenarten zu unterscheiden (97,100,110,111).

Mikrovakuoläre Algen wie *Chlorella fusca* verfügen über keine wesentlichen Speichermöglichkeiten für nicht-polymerisierbare Substanzen (137,172). Bei solchen Organismen bieten Ausscheidungsvorgänge deshalb eine einfache Möglichkeit zum Studium mancher physiologischer Prozesse. Bei geeigneter Fragestellung

können Messungen im Kulturmedium auch über längere Zeiträume hinweg Daten zur Metabolisierung (gemessen als Aufnahme oder Ausscheidung) bestimmter Substanzen liefern. Gleichzeitig läßt sich bei diesen Algen die Versorgung mit Nährstoffen leicht über die Zusammensetzung des Mediums steuern, wenn nicht - wie etwa bei Phosphat (121) - intrazelluläre Speicherverbindungen existieren. So ist für *Chlorella fusca* bekannt, daß der Sulfatpool dieser Algen unter Schwefelmangelbedingungen verhältnismäßig schnell erschöpft ist und daß auch anderweitige verfügbare Schwefelreserven kaum existieren (16).

Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, an Hand von Aufnahmeraten und eventuell vorhandenen Ausscheidungsprodukten zu untersuchen, ob entsprechende Wechselwirkungen, wie sie zwischen C- und N-Stoffwechsel beobachtet worden waren, auch zwischen S- und N-Stoffwechsel sichtbar werden. Eine gegenseitige Beeinflussung dieser beiden reduzierenden photosynthetischen Stoffwechselwege ist anzunehmen; Ergebnisse liegen dazu bisher kaum vor (56,138). Darüber hinaus sollte der Einfluß der Kohlenstoffverfügbarkeit auf die Stickstoffausscheidung genauer, vor allem auch bezüglich möglicher physiologischer Ursachen, untersucht werden. Im Mittelpunkt standen dabei Bildung, Transport und Weiterreduktion von Nitrit in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen.

2 Material und Methoden

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Verwendete Organismen

Chlorella fusca 211-8b stammte aus der Algensammlung der Universität Göttingen, *Synechococcus* 6301 vom Institute Pasteur in Paris.

2.1.2 Anzucht

Die Algen wurden in "Batch-Kulturen" im Dauerlicht (15 000 Lux) bei 30°C in einem Kniese-Kulturapparat gezogen. Sie wuchsen in 1l-Pirsonflaschen, die jeweils 750 ml von Medium folgender Zusammensetzung enthielten:

für *Chlorella*

KNO ₃	5 mM
KH ₂ PO ₄	0.5 mM
K ₂ HPO ₄	0.5 mM
Mg(NO ₃) ₂	2 mM
Ca(NO ₃) ₂	0.25 mM
Na ₂ SO ₄	0.3 mM
FeCl ₂ /EDTA	je 0.09 mM

Spurenelemente:

H ₃ BO ₃	23.1 µM
Na ₂ MoO ₄	0.045 µM
Mn(NO ₃) ₂	6.3 µM
ZnCl ₂	0.37 µM
Cu(NO ₃) ₂	0.16 µM

für *Synechococcus*

NaNO ₃	17.5 mM
K ₂ HPO ₄	0.2 mM
MgSO ₄	0.3 mM
CaCl ₂	0.25 mM
Citronensäure	0.03 mM
Ammoniumeisen-III-citrat	6 mg/l
MgCl ₂ /EDTA	je 2.5 µM
Na ₂ CO ₃	0.4 mM

Spurenelemente:

H ₃ BO ₃	46.3 µM
MnCl ₂	9.1 µM
ZnSO ₄	0.77 µM
Na ₂ MoO ₄	1.6 µM
CuSO ₄	0.32 µM
Co(NO ₃) ₂	0.17 µM

Das fertige Medium wurde in den Flaschen für 30 Minuten autoklaviert. Im Schwefelmangelmedium wurde für *Chlorella* die Na₂SO₄-Konzentration ersatzlos verringert, im Blaualgenmedium wurde MgSO₄ durch die gleiche Menge an MgCl₂ ersetzt. Ethansul-

fonsäure wurde mit NaOH neutralisiert und in dieser Form vor dem Autoklavieren zugegeben. Andere organische Schwefelverbindungen wurden - evtl. nach Neutralisation - dem autoklavierten Medium durch Sterilfiltration zugesetzt. Im N-Mangelmedium bei *Chlorella* wurde zunächst die Menge an KNO_3 ersatzlos verringert bzw. weggelassen; bei Wegfall auch von $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ und $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ wurden die Kationen in Form ihrer Chloride ersetzt. Puffersubstanzen wurden dem Medium vor dem Autoklavieren zugegeben und der gewünschte pH-Wert mit KOH eingestellt.

Zusätze nach dem Animpfen erfolgten durch Sterilfiltration. Die Belüftung wurde mit Preßluft durch Wattefilter durchgeführt. Bei Zusatz von 5% CO_2 (v/v) wurde dessen Konzentration mit Hilfe von Rotametern kontrolliert. Bei CO_2 -freier Begasung wurde entweder N_2 verwendet oder Luft zur Entfernung des enthaltenen Kohlendioxids mittels einer Glasfritte durch 1 N KOH geleitet.

Die Wachstumsdauer betrug - soweit nicht anders angegeben - 5 Tage.

Die Stammkulturen beider Organismen wurden in 100 ml - Erlenmeyerkolben bei Dauerlicht, zunächst im Rundschüttler, dann stehend gezogen. Die Kolben enthielten 50 ml des jeweils oben angegebenen Mediums. Sie wurden alle 4 (*Synechococcus*) bzw. 6 bis 8 Wochen (*Chlorella*) überimpft.

Die Batchkulturen wurden mit möglichst geringen Volumina angeimpft, um den Nährstoffeintrag in Mangelkulturen zu minimieren. Das Animpfvolumen betrug 135 μl bei *Chlorella* und 2 ml bei *Synechococcus*.

Wenn Veränderungen in der Zusammensetzung des Mediums über mehrere Stunden oder Tage gemessen werden sollten, wurden die Proben unter einer Sterilbank entnommen. Um die Ammoniumproduktion auch in Kulturen mit alkalischem Medium vollständig erfassen zu können, wurde der Luftstrom nach Verlassen der Kulturen mittels einer Glasfritte durch 0.01 N HCl geleitet. Deren Ammoniumgehalt wurde dann parallel zu dem des Kulturmediums bestimmt.

2.1.3 Algenaufschluß

Die Kulturen wurden durch Zentrifugation geerntet (8 Minuten, 4 000 * g), in deionisiertem Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert (10 Minuten, 10 000 * g). Die so gewaschenen Algen wurden in Aufbrechpuffer (5 ml pro 1 g Naßgewicht) folgender Zusammensetzung möglichst homogen suspendiert: 0.1 M Tris/HCl pH 8.0, 10 mM MgCl₂; kurz vor der Verwendung wurde 10 mM Mercaptoethanol zugegeben. Der Aufschluß erfolgte durch zweimaliges Passieren einer Frenchpresse bei 12 000 PSI (1 PSI=7 kPa). Anschließend wurde 20 Minuten bei 20 000 * g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Rohextrakt für die Enzymtests eingesetzt; das Zentrifugationspellet wurde im ursprünglichen Volumen an Aufschlußpuffer, aber ohne Zusatz von Mercaptoethanol resuspendiert. Diese Suspension wurde zunächst durch 30sekündige Zentrifugation bei 1 100 * g von ganzen Zellen befreit, dann erneut für 20 Minuten bei 22 000 * g zentrifugiert. Das jetzt gewonnene Pellet wurde wiederum in Aufschlußpuffer aufgenommen (etwa 2/3 des ursprünglichen Volumens, ohne Mercaptoethanol-Zusatz) und für die Tests (gegebenenfalls nach 1:10 - Verdünnung) eingesetzt.

Für die Messung des Enzymverhaltens in den ersten 5 Stunden nach Veränderung der Begasungsbedingungen (s. 3.2.1.2 und 3.4.1.2) wurden 12 Kulturen parallel angeimpft und gezogen. Zu jedem Meß-Zeitpunkt mußte dann eine ganze Kultur geerntet werden, um ausreichendes Algenmaterial für die Messungen zu erhalten.

Für die Membranauftrennungen im Labor von Prof. Tischner (Pflanzenphysiologisches Institut, Universität Göttingen) wurden synchron gezogene Kulturen (162) von *Chlorella sorokiniana* 211-8k (Algensammlung Göttingen) verwendet. Der Aufschluß in einer Vibrogen-Zellmühle und die Auftrennung der Membranfragmente wurden nach Peuke et al. (129) durchgeführt.

2.1.4 Envelope-Auftrennungen

Präparationen von äußerem und innerem Envelope von Erbsenchloroplasten, die nach (29) gewonnen worden waren, wurden mir freundlicherweise von Dr. Soll (Botanisches Institut, Universität München) zur Verfügung gestellt.

2.2 Geräte

Die zur Bestimmung des CO₂-Volumens verwendeten Rotameter stammten von Dr. Hennig, Wehr.

Der Algenaufschluß erfolgte mit einer French Pressure Cell Press der American Instrument Company, Silver Springs, Maryland, USA.

Zentrifugationen wurden ungekühlt in einer Runne-Zentrifuge (Runne, Heidelberg) oder in einer Sorvall-Kühlzentrifuge (Du Pont Instruments, Bad Nauheim) durchgeführt.

Die Zellzahlen wurden in einer Neubauer'schen Erythrocyten-Zählkammer bestimmt.

Photometrische Bestimmungen erfolgten am Spectrophotometer DU-7 der Firma Beckman.

Für die pH-Wert-Bestimmungen wurde ein Digital Ionalyzer 801 A von Orion Research verwendet.

2.3 Chemikalien

Mehrere der verwendeten Thiole (D-Cystein, L-Cystin, Cysteamin, O-Methyl-L-Cystein und O-Ethyl-L-Cystein), L-Glutamin, NADH, Ferredoxin und die Reagenzien zur Ammoniumbestimmung (Phenol Nitroprusside Solution und Alkaline Hypochlorite Solution) stammten von Sigma (München).

Von Serva (Heidelberg) wurden die Sulfonsäurepuffer (MOPSO, TAPS, TAPSO, POPSO), Methylviologen, N(1-Naphthyl)-ethylendi-amin-hydrochlorid und N,N'-Dimethyl-p-phenylendiammoniumdichlorid bezogen.

Tris, FMN, Cytochrom c, DTNB und der Nitrat-UV-Test waren Produkte der Firma Boehringer (Mannheim).

Natriumthiosulfat und Mercaptoessigsäure (= Thioglykolsäure) stammten von Fluka (Buchs, Schweiz), Natriumhydrogenarsenat von Baker (Deventer, Holland).

DTE und Saccharose wurden von Roth (Karlsruhe) und SHAM von EGA-Chemie (Steinheim) bezogen.

Alle anderen Chemikalien stammten von Merck (Darmstadt).

2.4 Methoden

2.4.1 Nachweisverfahren

2.4.1.1 Nitratbestimmung

Nitrat wurde durch einen enzymatischen Test (Nitrat-UV-Test der Firma Boehringer, Mannheim) mit Hilfe von Nitratreduktase bestimmt. Aus der Messung des zur Reduktion verbrauchten NADPH/H⁺ (Extinktionsdifferenz bei 340 nm) wurde die Menge an eingesetztem Nitrat berechnet.

2.4.1.2 Nitritbestimmung

Die Nitritbestimmung erfolgte nach der modifizierten Diazotierungsmethode von Nicholas und Nason (126). Ein Aliquot der Probe wurde mit 1 ml 1% Sulfanilsäure in 3 M HCl und 1 ml 0.02% N(1-Naphthyl)-ethylendiamin-hydrochlorid versetzt; nach 45 Minuten wurde die Extinktion bei 538 nm bestimmt. Da die Nitritbestimmung durch höhere Thiolkonzentrationen gestört wird, wurden die Proben in diesem Fall vor der Zugabe der Nachweisreagenzien mit 0.2 ml einer HgCl₂-Lösung (2% HgCl₂ in 0.4 N HCl) gemischt.

2.4.1.3 Ammoniumbestimmung

Es wurde der Phenol/Nitroprussid-Test der Firma Sigma (München) verwendet. Die Ammoniumbestimmungen aus dem Kulturmedium konnten direkt durchgeführt werden. Enzymatische Ansätze mußten wegen der störenden Wirkung zahlreicher Substanzen erst destilliert werden. Dies geschah über Nacht in Conway-Schälchen, die 1 N KOH zum Austreiben des Ammoniums und im Zentrum 0.01 N HCl enthielten.

2.4.1.4 Cysteinbestimmung

Cysteinbestimmungen wurden mit dem sauren Ninhydrin-Reagenz nach Gaitonde (57) durchgeführt. Das Reagenz enthielt 1.25 g Ninhydrin in 20 ml konzentrierter Salzsäure und 80 ml Eisessig. Die zu messenden Proben wurden in 1 ml (mit 0.1 M Tris/HCl pH 7.5 und 3 mM DTE) mit 1 ml des Gaitonde-Reagenzes versetzt,

mit Glasmurmeln bedeckt und 10 Minuten im siedenden Wasser inkubiert. Die Extinktion des sich dabei entwickelnden roten Komplexes wurde bei 546 nm gegen einen Nullwert gemessen.

2.4.1.5 Bestimmung reduzierter Thiolgruppen

Der Gehalt an SH-Gruppen wurde mit Ellman's Reagenz (43) bestimmt. Die Proben wurden mit Kaliumphosphatpuffer auf eine Konzentration von 0.1 M gebracht und mit 0.1 ml einer 1 mM methanolischen DTNB-Lösung versetzt. Aus der Extinktion bei 412 nm wurde der Thiolgruppengehalt berechnet.

2.4.1.6 H₂S-Bestimmung

Die Ansätze wurden mit je 0.1 ml von 0.02 M N,N'-Dimethyl-p-phenyldiammoniumdichlorid in 7.2 N HCl und von 0.03 M FeCl₃ in 1.2 N HCl versetzt, mit Gummihütchen verschlossen und 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die optische Dichte bei 670 nm gemessen (153).

2.4.1.7 Proteinbestimmung

In Rohextrakten wurde der Proteingehalt nach der Coomassie Blue - Methode von Bradford (20) mit Reagenz von Biorad (München) bestimmt.

Die Proteinbestimmung in den Membranfraktionen erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (107).

In beiden Fällen wurde Rinderserumalbumin zum Erstellen der Eichkurven verwendet.

2.4.1.8 Stickoxid-Bestimmungen

Die gaschromatographischen Bestimmungen von NO und N₂O wurden freundlicherweise im Labor von Prof. Rennenberg in Garmisch-Partenkirchen (Fraunhofer-Institut) durchgeführt.

2.4.2 Enzymmessungen

2.4.2.1 Nitratreduktase (E.C 1.6.6.1)

Der Ansatz enthielt in einem Endvolumen von 0.5 ml: 100 µmol Kaliumphosphatpuffer pH 8.0, 1 µmol Kaliumnitrat, 75 nmol NADH₂ und Rohextrakt. Er wurde für 15 Minuten bei 30°C inkubiert und

danach durch Zugabe der Nitrit-Nachweisreagenzien (s. 2.4.1.2) gestoppt.

2.4.2.2 Nitritreduktase (E.C 1.7.7.1)

Das Enzym wurde bei *Chlorella* in einem 1 ml - Ansatz folgender Zusammensetzung gemessen: 300 µmol Tris/HCl pH 7.5, 3 µmol Natriumnitrit, 700 nmol Methylviologen, 100 nmol EDTA, 150 µl Dithionitlösung (jeweils 250 mg Natriumdithionit und Natriumhydrogencarbonat wurden in 10 ml deionisiertem Wasser gelöst) und Rohextrakt. Nach 15minütiger Inkubation im Wasserbad bei 30°C wurde 0.1 ml der Ansätze entnommen, mit H₂O 1:10 verdünnt und am Whirlmix bis zum Verschwinden der blauen Farbe oxidiert. 0.2 ml dieser Verdünnung wurden für die Nitritbestimmung (s.o.) eingesetzt. Die Rate der Nitritreduktion wurde aus der Extinktionsdifferenz zwischen den Enzymansätzen und einer Kontrolle ohne Enzym berechnet.

Im Rohextrakt von *Synechococcus* wurde die Nitritreduktase-Aktivität nach Guerrero et al. (60) bestimmt. Die Ansätze enthielten in 2 ml neben Rohextrakt: 200 µmol Kaliumphosphatpuffer pH 7.0, 4 µmol NaNO₂, 1.5 µmol Methylviologen und 0.3 ml der oben angegebenen Dithionitlösung. Es wurde für 10 Minuten bei 30°C inkubiert, dann 0.1 ml des Ansatzes entnommen, 1:10 verdünnt und oxidiert. Für die Nitritbestimmung (s.o.) wurden 0.3 ml der Verdünnung verwendet.

2.4.2.3 Glutaminsynthetase (E.C 6.3.1.2)

Die Aktivität dieses Enzyms wurde als Transferase-Aktivität, d.h. mit Glutamin als Ausgangssubstanz, nach Rhodes und Stewart (140) gemessen. In einem Endvolumen von 1 ml enthielten die Ansätze neben Rohextrakt: 95 µmol Tris/Acetat pH 6.4, 140 µmol L-Glutamin, 3.2 µmol MnCl₂, 0.3 µmol ADP, 20 µmol Arsenat und 18.5 µmol Hydroxylamin. Sie wurden 10 Minuten bei 37°C inkubiert und durch Zugabe von 1 ml einer 10 mM FeCl₃-Lösung in 8% TCA/1 M HCl gestoppt. Die Extinktion des entstehenden Glutamylhydroxamats wurde bei 500 nm gegen einen Nullwert ohne Enzymzusatz bestimmt.

2.4.2.4 Thiosulfatreduktase (E.C 2.2.8.1)

Die Bestimmung nach Schmidt et al. (150) enthält in einem Ansatz von 1 ml: 100 μmol Tris/HCl pH 9.0, 2 μmol DTE, 200 nmol Natriumthiosulfat und Rohextrakt. Die Inkubation erfolgte in Gläsern, die mit Gummistopfen verschlossen waren, für 30 Minuten bei 37°C. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe der H_2S -Nachweisreagenzien (s.o.) gestoppt.

2.4.3 Messung der membrankatalysierten Nitritreduktion

Die Ansätze enthielten in 2 ml: 150 μmol Tris/HCl pH 7.0, 6 μmol NaNO_2 , 160 nmol FMN, 3 μmol L-Cystein und 0.3 ml der auch für die Enzymmessungen (s. 2.4.2.2) verwendeten Dithionitlösung, sowie ein Aliquot der Membransuspension. Die Ansätze wurden einzeln durch aufeinanderfolgende Zugabe von L-Cystein und Dithionit gestartet und 5 bis 10 Minuten bei 30°C inkubiert. Danach wurden 0.1 ml der Ansätze entnommen, mit 0.8 mM Methylviologenlösung auf das Zehnfache verdünnt und bis zur vollständigen Oxidation des Dithionits am Whirlmix geschüttelt. Die Verwendung von Methylviologenlösung zum Verdünnen machte noch reduziertes Dithionit leicht sichtbar. In 0.2 ml des verdünnten, oxidierten Ansatzes wurde der Nitritgehalt bestimmt und die membrankatalysierte Reduktion aus der Differenz zu einer Kontrolle, die ohne Membranzusatz inkubiert worden war, berechnet.

Wenn die Reduktionsrate ohne Cystein-Zusatz bestimmt werden sollte, wurde - ansonsten unter Beibehaltung der Konzentrationen - in einem Endvolumen von 1 ml inkubiert, die Puffermenge aber auf 100 μmol erhöht.

Bei Messung der 5-Stunden-Kinetiken (s. 3.4.1.2) wurden parallel die Reduktionsraten mit und ohne Cystein-Zusatz gemessen. Es ergab sich ein grundsätzlich gleicher Aktivitätsverlauf; in der mit Cystein gemessenen Reihe waren die Schwankungen zwischen einzelnen Messungen - wohl wegen des großen Hochrechnungsfaktors - aber stärker. Deshalb wurden die ohne Cystein ermittelten Werte dargestellt.

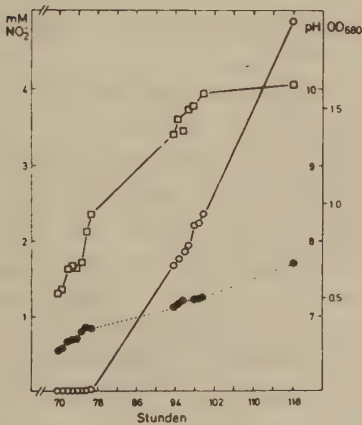
3 Ergebnisse

3.1 Langzeitversuche an *Chlorella*-Kulturen zur Abhängigkeit der Nitratassimilation von den Wachstumsbedingungen

3.1.1 Nitritausscheidung unter Kohlenstoffmangel-Bedingungen

3.1.1.1 Nitritausscheidung bei Luftbegasung

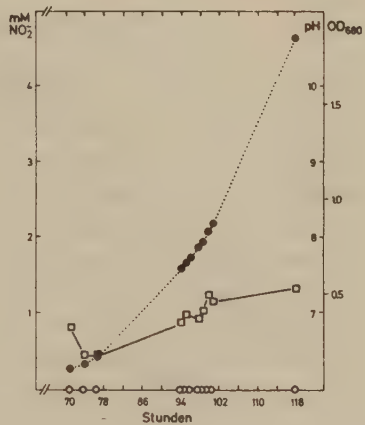
Kulturen von *Chlorella fusca*, die ausschließlich mit Luft begast werden und im Dauerlicht wachsen, scheiden ab einer bestimmten Dichte, die etwa am dritten Tag nach dem Animpfen erreicht wird, zunehmende Mengen Nitrit ins Wachstumsmedium aus (Abbildung 1a). Die Geschwindigkeit der Nitritausscheidung nimmt rasch zu, und am 5.Tag nach dem Animpfen wurden Nitritkonzentrationen bis zu 6 mM gemessen. Diese Nitritexkretion



Abbildungung 1a

Wachstum von *Chlorella fusca* bei unterschiedlichem CO₂-Partialdruck

Kulturen in Normalmedium wurden nach dem Animpfen entweder mit Luft (Abb. 1a) oder mit Luft + 5% CO₂ (Abb. 1b) begast und der Verlauf von OD₆₈₀ (●—●—●), pH-Wert (□—□—□) und Nitritkonzentration (○—○—○) im Medium gemessen.



Abbildungung 1b

läßt sich verhindern, indem statt mit Luft (0.035% CO₂) (39) mit einem Gemisch aus Luft und 5% CO₂ begast wird. Ursache für die Nitritausscheidung ist also anscheinend CO₂-Mangel, der eintritt, wenn bei dichteren Kulturen die Kohlendioxid-Versorgung nicht mehr ausreicht. Trotzdem wachsen diese Kulturen noch, bestimmt als Zunahme der optischen Dichte bei 680 nm (d.h. der Chlorophyllabsorption) und der Zellzahl (Abbildung 1a); allerdings ist das Wachstum im Vergleich zu ausreichender CO₂-Versorgung stark verlangsamt (Abbildung 1b).

3.1.1.2 Nitrit- und Ammoniumexkretion bei Verringerung der CO₂-Konzentration

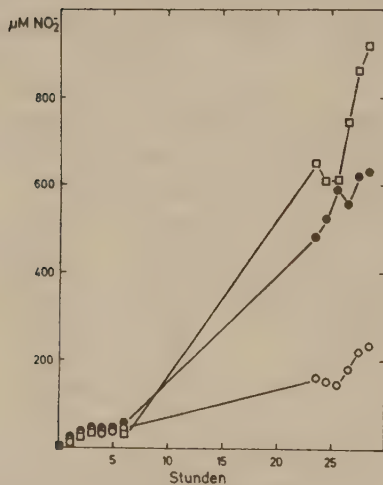


Abbildung 2a

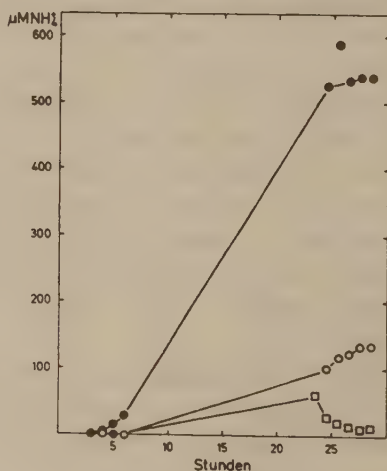


Abbildung 2b

Nitrit- und Ammoniumausscheidung bei C-Mangel

Chlorella fusca wurde zunächst 4 Tage mit Luft + 5% CO₂ gezogen, danach wurde mit Luft (□-□-□), CO₂-freier Luft (●-●-●) oder N₂ (○-○-○) begast. Die einsetzende Nitrit-ausscheidung ist in Abb. 2a, die Ammoniumexkretion in Abb. 2b dargestellt.

Bei Kulturen, die vom Animpfen an ununterbrochen mit Luft begast wurden, tritt der CO_2 -Mangel beim Erreichen einer bestimmten, kritischen Algendichte ein. Zu einem definierten Zeitpunkt läßt er sich herbeiführen, indem *Chlorella*-Kulturen zunächst mit Luft + 5% CO_2 und dann mit limitierender CO_2 -Menge, d.h. entweder mit Luft oder ganz ohne CO_2 mit CO_2 -freier Luft oder Stickstoff begast werden. In jedem der 3 genannten Fälle beginnt die Nitritexkretion innerhalb kurzer Zeit (15 bis maximal 30 Minuten) (Abbildung 2a). Dabei ist auffällig, daß beim völligen Fehlen von CO_2 neben Nitrit auch nennenswerte Mengen an Ammonium ausgeschieden werden (Abbildung 2b). Im Unterschied dazu findet man bei Begasung mit Luft - also mit niedriger CO_2 -Konzentration - Ammonium, wenn überhaupt, erst sehr viel später im Medium als Nitrit und außerdem in Konzentrationen (μM -Bereich), die mehrere Zehnerpotenzen unter den gleichzeitig gemessenen Nitritkonzentrationen liegen.

3.1.1.3 Lichtabhängigkeit der Nitritexkretion

Da die Nitratassimilation bei Pflanzen ein photosynthetischer Prozeß ist, war es naheliegend, den Einfluß des Lichtes auf die Nitritausscheidung zu untersuchen. Von verdunkelten, belüfteten Kulturen wird grundsätzlich kein Nitrit ausgeschieden, unabhängig davon, ob sie vorher nitritfrei waren oder als Folge mangelnder CO_2 -Versorgung bereits Nitrit ausgeschieden hatten (ohne Abbildung).

Um die Nitritausscheidung in ihrer Abhängigkeit von der Lichtintensität zu untersuchen, wurden Kulturen nach dem Animpfen zunächst bei normaler Lichtintensität (etwa 15 000 Lux) gezogen. Nach bzw. kurz vor Einsetzen der Nitritausscheidung wurde die Lichtintensität auf Werte zwischen 5 800 Lux und 11 200 Lux verringert und Wachstum und Nitritausscheidung mit einer normal beleuchteten Kontrolle verglichen (Abbildung 3 a - c). Dabei ergibt sich eine relativ niedrige Lichtsättigung des Phänomens: Bei 8 000 Lux beobachtet man noch Nitritausscheidung mit der gleichen Geschwindigkeit wie in der Kontrolle (nicht dargestellt). Erst bei Verringerung auf 5 800 Lux wird kein Nitrit mehr ausgeschieden bzw., wenn die Lichtintensität erst

nach Beginn der Nitritausscheidung herabgesetzt wird, geht dessen Konzentration sogar geringfügig zurück (Abbildung 3a). Bei höherer Lichtintensität (8 000 Lux, 11 200 Lux) wird höchstens der Beginn der Nitritexkretion gegenüber den mit 15 000 Lux beleuchteten Kontrollen etwas hinausgezögert; später ist die Rate der Nitritausscheidung genauso hoch wie in der Kontrolle.

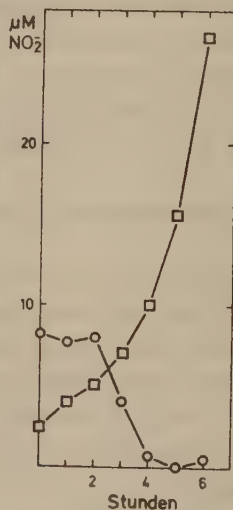
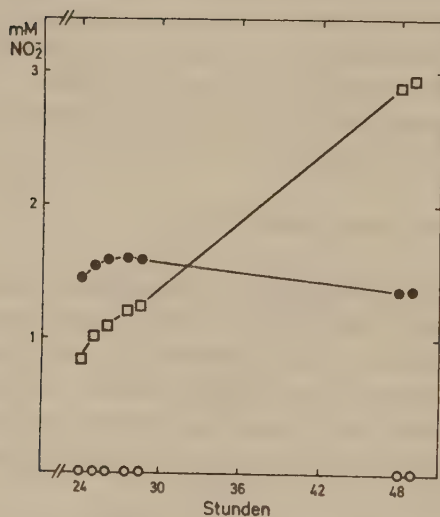


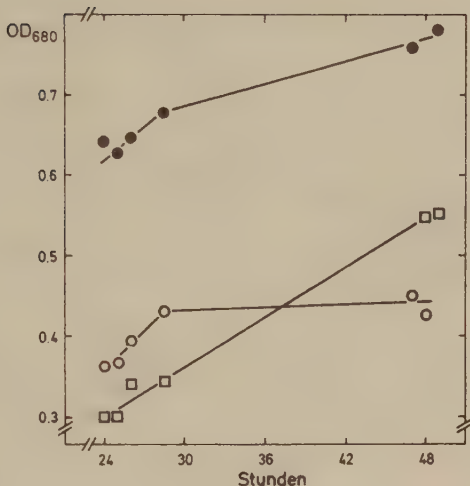
Abbildung 3a

Abbildung 3b

Vergleich der Nitritexkretion bei 15 000 Lux und 5 800 Lux Kulturen von *Chlorella fusca* wurden zunächst unter Standardbedingungen gezogen (s. 2.1.2). Am 3. (○—○—○) bzw. 4. Tag (●—●—●) des Wachstums wurde für je eine Kultur die Beleuchtungsstärke auf 5 800 Lux verringert und die Nitritexkretion mit einer Kontrolle (□—□—□), die bei 15 000 Lux wuchs, verglichen. Alle Kulturen wurden mit Luft begast.

Abbildung 3c
Wachstum bei ver-
ringelter Licht-
intensität

Verlauf der opti-
schen Dichte in
den Kulturen aus
Abb. 3a,
Symbole wie dort.



3.1.1.4 Einfluß des pH-Wertes auf die Nitritausscheidung

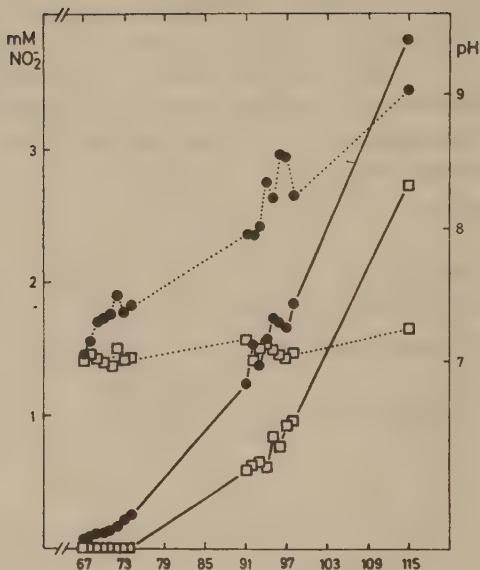
Gleichzeitig mit dem Beginn der Nitritausscheidung mißt man im *Chlorella*-Medium einen raschen Anstieg des pH-Wertes: Während dieser zunächst im neutralen bis leicht sauren Bereich liegt und dort durch die Pufferwirkung des Kohlensäure/Hydrogencarbonat-Systems stabilisiert wird, steigt er plötzlich auf Werte über pH 8 an und liegt nach fünftägigem Wachstum in der Regel zwischen pH 10 und pH 11 (Abbildung 1a).

Bei Algen, die mit Zusatz von 5% CO₂ begast werden, bleibt die Pufferkapazität ausreichend und noch sehr dichte Kulturen haben einen pH-Wert um pH 7 (Abbildung 1b).

Da der Zusatz von CO₂ zum Begasungsgemisch also gleichzeitig das Kohlenstoffangebot erhöht und den pH-Wert des Mediums stabilisiert, muß nach weitergehenden Ansätzen gesucht werden, um zu entscheiden, welcher dieser beiden Effekte die Nitritausscheidung verhindert. Deshalb wurden luftbegaste Kulturen verglichen, die im einen Fall in Normalmedium wuchsen, im anderen Fall in Normalmedium, dessen pH-Wert mit 20 mM MOPSO/KOH-Puffer im schwach Sauren abgepuffert war.

Abbildung 4

Pufferwirkung auf
die Nitritaus-
scheidung



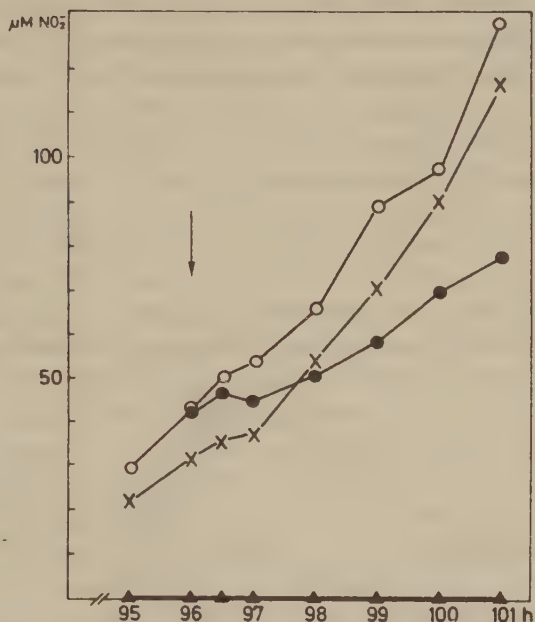
Der Verlauf von pH-Wert (.....) und Nitritausscheidung (—) bei Luftbegasung wurde in einer Kontrollkultur (● ● ● ●) und in einer mit 20 mM MOPSO/KOH (□ □ □ □) gepufferten Kultur verglichen.

Beide Kulturen scheiden Nitrit in der gleichen Größenordnung aus, auch wenn die Exkretion im gepufferten Medium mit einer mehrstündigen Verzögerung einsetzt (Abbildung 4). Da man bei gepufferten Kulturen, die mit Luft + 5% CO₂ begast werden, kein Nitrit im Medium findet, ist nicht die Puffersubstanz selbst für die Nitritausscheidung verantwortlich. Nitritausscheidung und pH-Anstieg sind also zwei gleichzeitig auftretende, durch CO₂-Mangel hervorgerufene Phänomene, die aber voneinander unabhängig sind.

3.1.1.5 Einfluß von Ammoniumzugabe auf die Nitritausscheidung

Abbildung 5

Wirkung von NH_4Cl
auf die Nitritex-
kretion



Zu einer *Chlorella*-Kultur wurde beim Animpfen 2 mM NH_4Cl zugesetzt ($\blacktriangle-\blacktriangle-\blacktriangle$). Eine weitere Kultur wurde nach Beginn der Nitritausscheidung geteilt: Die eine Hälfte der Kultur wuchs unter Standardbedingungen weiter (O-O-O), der anderen wurde 2 mM NH_4Cl zugesetzt ($\bullet-\bullet-\bullet$). Die Nitritexkretion in diesen Kulturen wurde mit einer Kontrolle (x-x-x) verglichen. Alle Kulturen wurden mit Luft begast.

Die Nitratreduktion bei Algen wird normalerweise an ihrem ersten Schritt, nämlich bereits bei der Nitrataufnahme unterbrochen, wenn reduzierter Stickstoff im Überfluß vorhanden ist (106,130,166). Deshalb wurde die Wirkung von zugegebenem Ammonium auf die Nitritausscheidung untersucht (Abbildung 5). Wird 1 mM Ammoniumchlorid bereits beim Animpfen zugegeben, so findet man auch nach mehrtägiger Begasung nur mit Luft kein Nitrit im

Medium. Späterer Zusatz von Ammoniumchlorid wirkt je nach "physiologischem Alter" der Kulturen sehr unterschiedlich: In einem relativ frühen Stadium verlangsamt sich die Nitritausscheidung in Gegenwart von NH_4^+ -Ionen, später kommt es sogar zu beschleunigter Nitritexkretion. Dabei wurde kontrolliert, daß trotz des hohen pH-Wertes kein nennenswerter Ammoniumverlust mit dem Luftstrom auftritt.

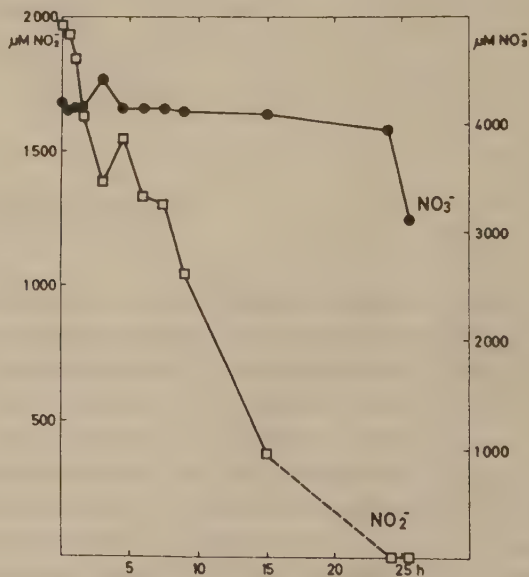
3.1.2 Nitritaufnahme bei hohem CO_2 -Angebot

3.1.2.1 Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks nach Nitritexkretion

Bei Begasung mit Zusatz von 5% CO_2 zur Luft findet man bei *Chlorella fusca* in Normalmedium keine Nitritexkretion. Wird für

Abbildung 6

Nitritaufnahme bei
Erhöhung des CO_2 -
Partialdrucks



Chlorella fusca wuchs 4 Tage bei Luftbegasung. Nach Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks auf 5% wurde der Verlauf von Nitrit- und Nitratkonzentration im Medium gemessen.

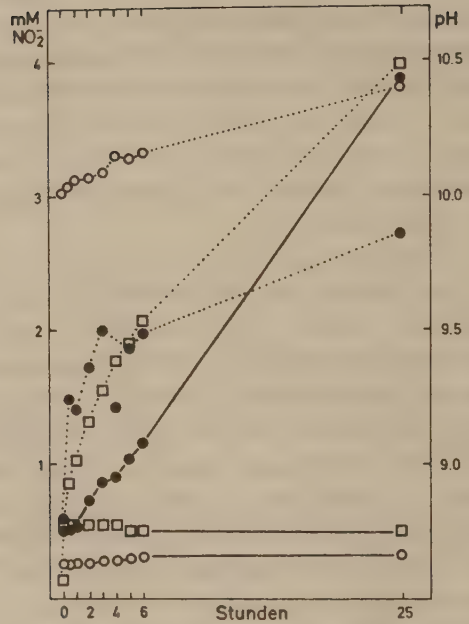
Kulturen, die unter Luftbegasung Nitrit ins Medium abgegeben hatten, die CO_2 -Konzentration auf 5% erhöht, so wird das vorher ausgeschiedene Nitrit wieder aufgenommen (Abbildung 6). Die Nitritaufnahme setzt bereits nach kurzer Zeit (innerhalb von 30 Minuten) ein; Kulturen, die zur Zeit der CO_2 -Partialdruckerhöhung Nitrit in millimolaren Konzentrationen enthielten, sind nach 14 bis 20 Stunden wieder nitritfrei. Solange Nitrit im Medium vorhanden ist, wird die Nitrataufnahme unterbrochen und setzt erst wieder ein, wenn das Nitrit nahezu ganz aufgenommen ist (Abbildung 6).

3.1.2.2 Zugabe von (Hydrogen-)Carbonat nach Nitritexkretion

Bei Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks im Luftstrom sinkt der pH-Wert im Kulturmedium innerhalb weniger Minuten in den Neutralbereich; dieser Vorgang ist als Pufferungseffekt nicht an die Gegenwart von Algen gebunden. Gibt man statt Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks etwa 50 mM Natriumhydrogencarbonat oder ein Gemisch aus Hydrogencarbonat und Carbonat zu, so verändert sich der pH-Wert der Kulturen kaum; aber dennoch wird die weitere Nitritexkretion gebremst (Abbildung 7). Bei Zugabe von reinem Hydrogencarbonat kommt es langfristig zu einer geringfügigen Nitritaufnahme; nitritfrei werden die Kulturen jedoch nicht wieder.

Abbildung 7

Wirkung von Carbonat-
Zugabe auf die
Nitritausscheidung



Nach 4tägigem Wachstum von *Chlorella* mit Luftbegasung wurde je einer Kultur 50 mM Hydrogencarbonat (□□□) bzw. ein Gemisch aus Carbonat und Hydrogencarbonat (○○○) zugegeben. pH-Wert (· · · · ·) und Nitritkonzentration (—) in diesen Kulturen wurden mit einer Kontrolle in Standardmedium (● ● ●) verglichen.

3.1.2.3 Wirkung von Zuckerzugabe unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Als weitere Kohlenstoffquelle neben CO₂ und Carbonaten wurden Algen, die bereits Nitrit ausgeschieden hatten, verschiedene Zucker (Glukose, Fruktose, Saccharose; Konzentration 20 mM) an-

gebieten. Bei belichteten, luftbegasteten Kulturen haben sie keinerlei Einfluß auf die Nitritausscheidung (Abbildung 8). Wenn die Kulturen jedoch gleichzeitig mit Glukosezugabe verdunkelt werden, dann setzt nach einigen Stunden Nitritaufnahme ein (Abbildung 8). Vorher kann die Nitritkonzentration noch längere Zeit steigen, obgleich *Chlorella* sonst im Dunkeln kein Nitrit ausscheidet (vgl. 3.1.1.3). Bei Kulturen, die im Licht ohne CO₂ (mit CO₂-freier Luft oder Stickstoff) begast werden, verringert Glukose-Zugabe die Ausscheidung sowohl von Nitrit als auch von Ammonium (Abbildung 9).

Abbildung 8

Wirkung von Zuckerzugabe auf die Nitritexkretion in Licht- und Dunkelkulturen

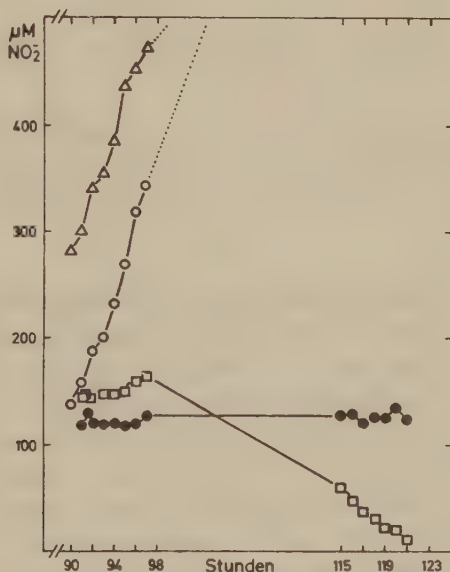
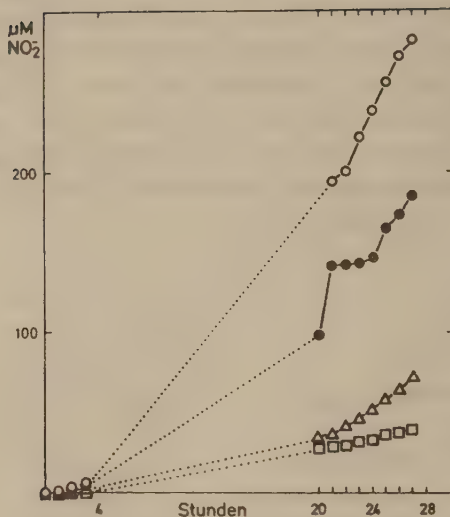


Abbildung 9

Zuckerzugabe zu
 CO_2 -frei begasten
Kulturen



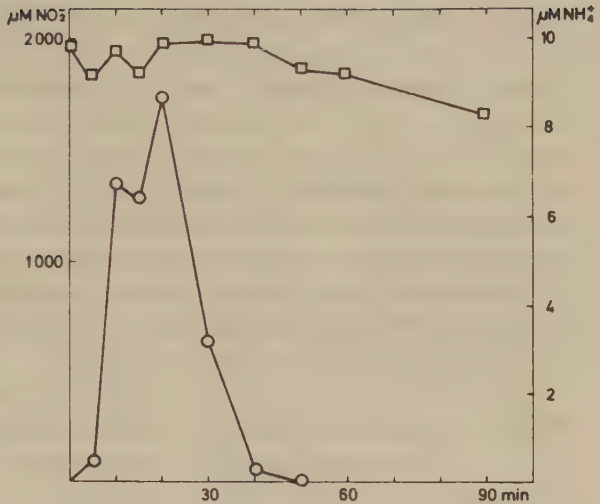
Chlorella-Kulturen wuchsen 3 Tage lang bei Luftbegasung. Danach wurden sie entweder mit CO_2 -freier Luft (○ ○, △ △) oder mit N_2 (● ●, □ □) begast. Jeweils eine Kultur erhielt gleichzeitig 20 mM Glukose (△ △, □ □).

3.1.2.4 Nitritzugabe zu langfristig CO_2 -gesättigten Kulturen

Gibt man 2 mM Nitrit (als Kalium- oder Natriumsalz) zu *Chlorella*-Kulturen zu, die mit 5% CO_2 begast wurden und also kein Nitrit enthalten, so wird es sofort aufgenommen (Abbildung 10). Charakteristisch ist dabei eine kurzfristige, zwar geringfügige aber reproduzierbare Ammoniumausscheidung bis zu Konzentrationen von etwa 50 μM kurz nach Nitritzugabe.

Abbildung 10

Nitritzugabe zu
CO₂-gesättigten
Kulturen



Chlorella-Kulturen, die 4 Tage lang mit Luft + 5% CO₂ gewachsen waren, wurde 2 mM KNO₂ zugegeben und danach die Nitrit- (□—□—□) und Ammoniumkonzentration (○—○—○) im Medium gemessen.

3.1.3 Aufnahmeraten für verschiedene N-Salze in Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen

Um einen Überblick darüber zu gewinnen, welche anorganischen Stickstoff-Ionen *Chlorella* je nach Anzuchtbedingungen nützen kann, wurden Kulturen in Normalmedium gezogen, mit Luft (z.T. mit CO₂-Zusatz) begast und am 4. bzw. 5. Wachstumstag in neues Medium umgewaschen, das als einzige Stickstoffquelle ein oder mehrere Stickstoffsalze (KNO₃, KNO₂ bzw. NH₄Cl) in 2 mM Konzentration enthielt. Diese im Vergleich zum Normalmedium relativ niedrige Konzentration wurde gewählt, um toxische Wirkungen von Nitrit auch im leicht sauren Bereich oder von Ammonium ausschließen zu können und um ohne starke Verdünnungen im Meßbereich der photometrischen bzw. enzymatischen Nachweisverfahren zu liegen. So konnte einerseits die Aufnahmerate für jedes Ion bei Begasung mit Luft oder CO₂ ermittelt werden, andererseits

die gegenseitige Beeinflussung der Ionen, wenn mehrere gleichzeitig im Medium vorliegen.

3.1.3.1 Aufnahmeraten für jeweils einzeln vorliegende N-Salze

In Tabelle 1 sind die Netto-Aufnahmeraten für Nitrat, Nitrit und Ammonium zusammengestellt, wie sie gemessen wurden, wenn die Ionen jeweils als einzige N-Quelle bei unterschiedlicher CO₂-Versorgung angeboten wurden. Dabei fällt auf, daß die Nitrataufnahme durch den CO₂-Mangel bei Begasung nur mit Luft weniger stark verringert wird (auf etwa 65%) als die Aufnahme von Nitrit (31%) oder Ammonium (19%).

Tabelle 1 Aufnahmeraten für einzelne Stickstoff-Ionen bei unterschiedlicher CO₂-Versorgung

Begasung	Aufnahmeraten (μmol/h*Kultur)		
	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	NH ₄ ⁺
Luft	42	32	12
Wechsel Luft 5% CO ₂	42	75	75
5% CO ₂	64	105	62

Die Kulturen wuchsen für 4 (bei CO₂-Begasung) bzw. 5 Tage (bei Luftbegasung) in Normalmedium und wurden zu Versuchsbeginn in ansonsten N-freies Normalmedium umgewaschen, das KNO₃, KNO₂ oder NH₄Cl in 2 mM Konzentration enthielt. Die Aufnahmeraten wurde als Abnahme der jeweiligen Konzentration im Medium gemessen.

3.1.3.2 Aufnahmeraten bei gleichzeitigem Angebot mehrerer N-Verbindungen

Die Aufnahmeraten durch *Chlorella* - Kulturen bei gleichzeitigem Angebot von mehreren Stickstoffionen sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Es zeigt sich unter anderem, daß

- unter CO₂-Mangel die Nitrataufnahme durch Ammonium kaum gehemmt wird (vgl. 3.1.1.5)

- die Nitritaufnahme auch bei hoher CO_2 -Verfügbarkeit nicht durch Ammonium gehemmt wird
- die bevorzugte Aufnahme von Nitrit gegenüber Nitrat (vgl. 3.1.2.4) nur beim Wechsel von Luftbegasung auf Begasung mit 5% CO_2 erfolgt, nicht dagegen bei bereits vorher ausreichender CO_2 -Versorgung.

Tabelle 2 Aufnahmeraten beim gleichzeitigen Vorliegen mehrerer N-Quellen und unterschiedlicher CO_2 -Konzentration

Begasung	N-Quellen	Aufnahmeraten ($\mu\text{mol/h} \cdot \text{Kultur}$)		
		NO_3^-	NO_2^-	NH_4^+
Luft	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	71	+7.5	-
	$\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$	58	+50	24
	$\text{NO}_2^- / \text{NH}_4^+$	-	19	25
	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^- / \text{NH}_4^+$	65	+25	19
Luft >5% CO_2	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	0	47	-
	$\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$	15	-	39
	$\text{NO}_2^- / \text{NH}_4^+$	-	18	52
	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^- / \text{NH}_4^+$	-	15	43
5% CO_2	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$	76	60	-
	$\text{NO}_3^- / \text{NH}_4^+$	9	-	68
	$\text{NO}_2^- / \text{NH}_4^+$	-	47	26
	$\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^- / \text{NH}_4^+$	40*	62	56

* Die angegebene Nitrataufnahmerate gilt nur für die ersten 3 Stunden nach dem Umwaschen; danach ging die Aufnahme auf Null zurück.

Die mit "+" versehenen Zahlen bedeuten Ausscheidungsraten.
Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 1.

3.1.4 Nitritausscheidung unter Schwefelmangelbedingungen

3.1.4.1 Nitritexkretion bei unterschiedlicher Sulfatausgangskonzentration

Parallel zu den Beobachtungen bei Kohlenstoffmangel wurde untersucht, ob auch bei Limitierung des neben Kohlenstoff und Stickstoff dritten Makronährelements, des Schwefels, Zwischenprodukte der Nitratassimilation ausgeschieden werden. Kulturen von *Chlorella fusca* wurden bei erhöhter CO_2 -Konzentration (5%) in Normalmedium, aber mit unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen an Natriumsulfat zwischen 6 μM und 300 μM gezogen. Trotz

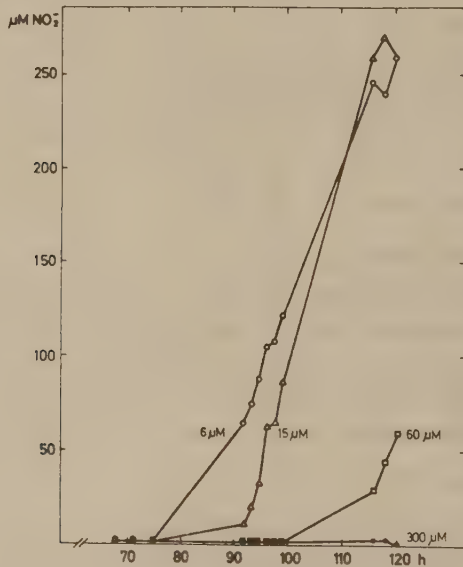


Abbildung 11 Nitritausscheidung in S-Mangel-Medium

Chlorella fusca wurde in Normalmedium, aber mit der jeweils angegebenen Sulfatkonzentration bei Begasung mit Luft + 5% CO_2 gezogen und die Nitritkonzentration im Medium gemessen.

ausreichender Kohlenstoffversorgung wurde nach einigen Tagen Nitrit im Medium gemessen, und zwar um so früher je niedriger die Ausgangskonzentration von Sulfat gewesen war (Abbildung 11). Bei ausgeprägtem Sulfatmangel findet man neben Nitrit auch geringe Mengen an Ammonium (ohne Abbildung).

Wird *Chlorella*, die in Normalmedium gewachsen und mit 5% CO₂ begast worden war, in sulfatfreies Medium überführt, so setzt die Nitritausscheidung nach etwa 6 Stunden ein (ohne Abbildung).

3.1.4.2 Einfluß von Ammoniumzugabe auf die Nitritausscheidung

Der Zusatz von reduziertem Stickstoff in Form von NH₄Cl - beim Animpfen oder nach Einsetzen der Nitritausscheidung - verhindert die Nitritanhäufung nicht. Im Gegenteil ist die Nitritausscheidung gegenüber einer Kontrolle ohne Ammonium oft erhöht, wohl weil der reduzierte - leicht verwertbare - Stickstoff den Stoffwechsel insgesamt beschleunigt und damit der Sulfatmangel früher auftritt (Ergebnisse nicht dargestellt).

3.1.4.3 Nitritausscheidung bei Wachstum auf verschiedenen S-Quellen

Da manche Verbindungen zwar den Schwefelbedarf von *Chlorella fusca* soweit decken können, daß die Algen vergleichbar schnell wachsen wie auf Sulfat, aber trotzdem ein Mangel an - oxidiertem - Schwefel (Sulfat) besteht (16), wurden D- und L-Cystein sowie Ethansulfonsäure daraufhin getestet, ob sie als einzige S-Quelle bzw. in Kombination mit Sulfat Nitritausscheidung bewirken (Tabelle 3). Von den eingesetzten oxidierten und reduzierten Schwefelverbindungen kommt es nur bei D-Cystein als einziger S-Quelle zu Nitritausscheidung; bei allen anderen Schwefelquellen bleibt das Medium nitritfrei - vorausgesetzt, die Kohlendioxid-Versorgung ist ausreichend.

Tabelle 3 Nitritausscheidung bei Wachstum auf verschiedenen S-Quellen

S-Quelle	Nitritausscheidung
Natriumsulfat	-
Ethansulfonsäure	-
L-Cystein	-
L-Cystein/Sulfat	-
D-Cystein	+
D-Cystein/Sulfat	-
keine	++

Die Kulturen wuchsen 5 Tage in Medium, das die jeweils angegebene(n) S-Quelle(n) in 0.3 mM Konzentration enthielt; sie wurden mit Luft + 5% CO₂ begast.

3.1.5 Wirkung verschiedener S-Quellen auf die Nitritaufnahme

3.1.5.1 Sulfatzugabe

Nitrit, das *Chlorella fusca* unter CO₂-Mangel ausgeschieden hatte, wird auf Erhöhung des CO₂-Partialdrucks hin rasch wieder aufgenommen. Gibt man zu Kulturen, die unter Schwefelmangel Nitrit ausgeschieden hatten, Sulfat zu, so beobachtet man ebenfalls Nitritaufnahme, die jedoch erst nach einer lag-Phase von 1.5 bis 2.5 Stunden einsetzt. Nach spätestens 24 Stunden ist das Medium nitritfrei (Abbildung 12a).

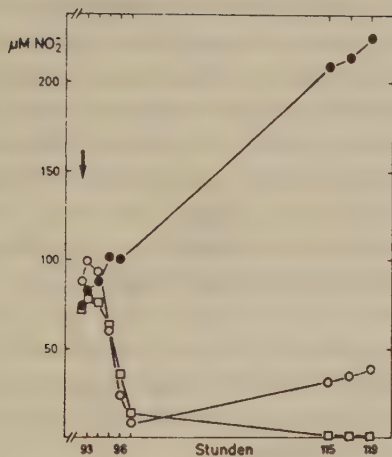


Abbildung 12 a

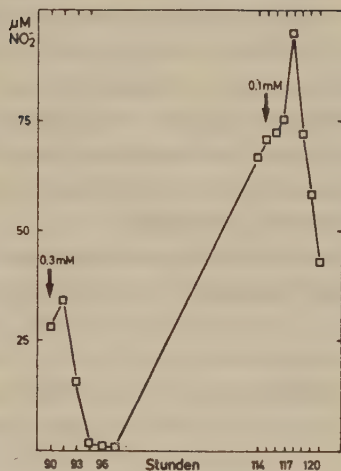


Abbildung 12 b

Chlorella fusca wuchs 4 Tage lang bei Begasung mit Luft + 5% CO₂ in Normalmedium, aber mit einer Ausgangskonzentration von nur 15 µM Na₂SO₄. Nach Zugabe von 0.3 mM Sulfat (□-□-□) oder L-Cystein (○-○-○) wurde die Nitritkonzentration im Medium beobachtet (Abb. 12a). Nachdem in der L-Cystein-Kultur über Nacht wieder Nitrit ausgeschieden worden war, wurde erneut 0.1 mM Cystein zugesetzt (Abb. 12b).

3.1.5.2 Zugabe verschiedener anorganischer und organischer S-Verbindungen

Neben Natriumsulfat wurden auch andere von *Chlorella* verwertbare Schwefelquellen (95) daraufhin untersucht, ob sie den S-Mangel-Zustand soweit umkehren, daß vorher ausgeschiedenes Nitrit wieder aufgenommen wird (Tabelle 4).

Zur Nitritaufnahme führt Zugabe von Sulfat, L-Cystein, O-Methyl- bzw. O-Ethyl-L-Cystein und - nach über 5 Stunden - die von Methionin. Nach Zugabe von 0.3 mM L-Cystein wird über Nacht

erneut Nitrit ausgeschieden, das jedoch nach weiterer Cystein-zugabe wieder aufgenommen wird (Abbildung 12b). Da L-Cystin keine Nitritaufnahme bewirkt, ist die erneute Nitritproduktion offensichtlich auf Oxidation von Cystein zu Cystin zurückzuführen. Damit stimmt überein, daß in *Chlorella*-Kulturen 3 Stunden nach der Zugabe von 0.3 mM L-Cystein keine reduzierten SH-Gruppen mehr nachgewiesen werden konnten (ohne Abbildung); in algenfreiem, belüftetem Medium war Cystein nach 6 Stunden vollständig oxidiert.

Neben L-Cystin blieben auch D-Cystein, reduziertes Glutathion und Cysteamin ohne Einfluß auf die Nitritexkretion.

Tabelle 4 Nitritaufnahme bei Zugabe verschiedener S-Quellen

S-Quelle	Nitritaufnahme
Natriumsulfat	+
L-Cystein	+
D-Cystein	-
L-/D-Cystein	+
L-Cystin	-
O-Methyl-L-Cystein	+
O-Ethyl-L-Cystein	+
Cysteamin	-
Glutathion (reduziert)	-
L-Methionin	+

Chlorella-Kulturen wurden in Normalmedium mit nur 15 µM Sulfat gezogen und mit Luft + 5% CO₂ begast. Nach Einsetzen der Nitritausscheidung wurden die jeweils angegebenen S-Quellen in einer Konzentration von 0.3 mM zugesetzt (bei gleichzeitiger Zugabe von L- und D-Cystein Gesamtkonzentration 0.3 mM).

3.2 Enzymatische Untersuchungen

3.2.1 Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der C-Versorgung

Im allgemeinen geht man davon aus, daß die Nitritreduktase in Pflanzen in so großem Überschuß vorhanden ist, daß kaum freies Nitrit auftritt (61). Eine naheliegende Erklärung für die Nitritausscheidung durch *Chlorella fusca* unter Kohlenstoff- bzw. Schwefelmangel wäre daher, daß das Gleichgewicht zwischen den Enzymen der Nitratassimilation, besonders zwischen Nitrat- und Nitritreduktase, im Mangelzustand gestört ist. Deshalb wurden die Aktivitäten von Enzymen des Nitratstoffwechsels bei ausreichender Nährstoffversorgung und unter Mangelbedingungen verglichen. Als ein einfach meßbares Enzym des Schwefelstoffwechsels wurde oft zusätzlich die Thiosulfatreduktase bestimmt.

3.2.1.1 Vergleich der Aktivitäten bei 5% und 0.035% CO₂

In Tabelle 5 sind die in-vitro-Aktivitäten von Nitratreduktase, Nitritreduktase, Glutaminsynthetase und Thiosulfatreduktase

Tabelle 5 Enzymaktivitäten bei unterschiedlicher CO₂-Versorgung

	µmol/mg Protein * h	
	Luft + 5% CO ₂	Luft
Nitratreduktase	3.4	2.6
Nitritreduktase	20.1	1.9
Glutaminsynthetase	80.4	60.2
Thiosulfatreduktase	0.21	0.24

Die Kulturen wurden nach 5tägigem Wachstum in Normalmedium, das als N-Quelle 8 mM KNO₃ enthielt, aufgeschlossen und die Enzymaktivitäten im Rohextrakt bestimmt.

nach Begasung mit Zusatz von 5% CO₂ und nach Begasung ausschließlich mit Luft einander gegenübergestellt. Neben vergleichsweise geringen Aktivitätsunterschieden der anderen Enzyme fällt eine um mehr als Faktor 10 geringere Aktivität der Nitritreduktase bei Luftbegasung auf.

3.2.1.2 Verlauf der Enzymaktivitäten nach Veränderung des CO₂-Partialdrucks

Charakteristisch, sowohl für die Nitritausscheidung durch *Chlorella* unter CO₂-Mangel als auch für die Nitritaufnahme bei Erhöhung des CO₂-Partialdrucks, ist die rasche Reaktion auf Veränderungen der Kohlendioxid-Verfügbarkeit (innerhalb von etwa 30 Minuten). Wenn die Ursache für Nitritausscheidung bzw. -aufnahme in der Änderung von Enzymaktivitäten liegt, müßte diese Änderung - jedenfalls bezüglich der in-vivo-Aktivitäten - in entsprechend kurzer Zeit erfolgen. Da die Aktivitäten mancher Enzyme in vivo schwer zu bestimmen und die Bestimmungsmethoden nicht unumstritten sind (94), wurden zunächst die in-vitro-Aktivitäten der obengenannten Enzyme in *Chlorella*-Rohextrakten gemessen, um erste Anhaltspunkte für das Enzymverhalten bei Veränderung des CO₂-Partialdrucks zu erhalten.

Der Verlauf der in-vitro-Aktivitäten innerhalb von 5 Stunden nach Veränderung des Begasungsmediums wurde für folgende Bedingungen untersucht (Abbildung 13):

- Erhöhung des CO₂-Partialdrucks von ca. 0.035% (Luft) auf 5% (Abbildung 13c)
- Verringerung des CO₂-Partialdrucks von 5% auf ca. 0.035%
- Umstellung der Belüftung von Luft + 5% CO₂ auf CO₂-freie Luft
- Umstellung der Belüftung von Luft + 5% CO₂ auf Stickstoff.

Da die Ergebnisse bei Verringerung des CO₂-Angebots grundsätzlich ähnlich sind und nur geringfügig davon beeinflusst werden, ob danach mit limitierendem CO₂ (aus der Luft) oder ganz ohne Kohlendioxid, aerob (CO₂-freie Luft) oder anaerob (Stickstoff) begast wird, wurde in Abbildung 13a repräsentativ der Verlauf nach Wechsel von 5% CO₂ zu CO₂-freier Luft dargestellt.

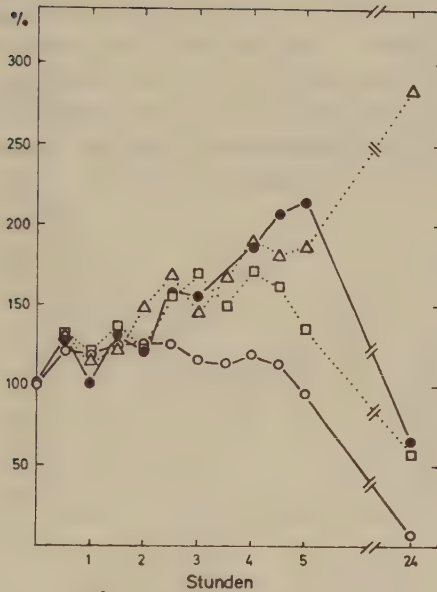


Abbildung 13 a Entwicklung der Enzymaktivitäten nach Wechsel der Begasung von Luft + 5% CO₂ auf CO₂-freie Luft

12 Kulturen von *Chlorella fusca* wurden 4 Tage lang mit Luft + 5% CO₂ gezogen. Nach Entzug des CO₂ wurde jede halbe Stunde eine Kultur geerntet und die Enzymaktivitäten in den Rohextrakten bestimmt: ●—●—● NAR, ○—○—○ NIR, □—□—□ GS, Δ—Δ—Δ TSR.

100 % Aktivität entsprachen (in μmol/mg*h): NAR 2.92; NIR 14.8; GS 67.22; TSR 0.31.

Wichtigstes Ergebnis bei Verringerung des CO₂-Partialdrucks ist, daß während des beobachteten Zeitraums alle gemessenen Enzymaktivitäten steigen. Der Überschuß der Nitritreduktase gegenüber der Nitratreduktase-Aktivität verringert sich zwar innerhalb von 5 Stunden geringfügig, aber noch nach dieser Zeitspanne liegt die Aktivität der Nitritreduktase bis Faktor 6 über der der Nitratreduktase (vgl. Abbildung 13b); dagegen ist

nach 24 Stunden die in-vitro-Aktivität der Nitritreduktase niedriger als die der Nitratreduktase (vgl. auch Tabelle 5). Die Nitritreduktase-Aktivität ist also zwar nach länger andauerndem CO_2 -Mangel so niedrig, daß das die Nitritausscheidung unter diesen Bedingungen erklären könnte. Bei plötzlicher Verringerung des CO_2 -Angebots sinkt sie jedoch verhältnismäßig langsam, so daß das kaum als Primärursache für die rasch einsetzende Nitritausscheidung in Frage kommt.

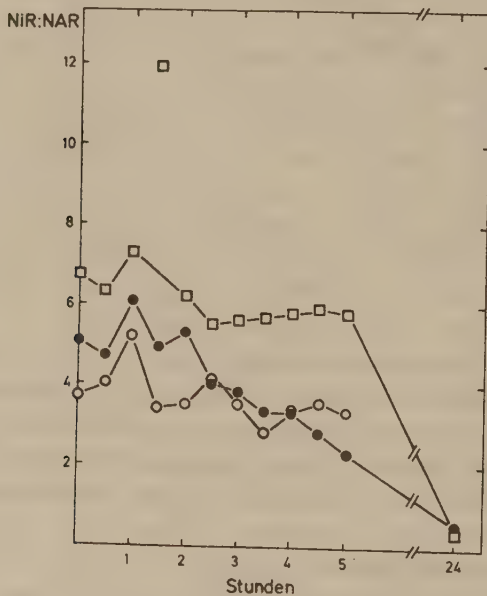


Abbildung 13 b Veränderung des Verhältnisses von Nitritreduktase- zu Nitratreduktase-Aktivität nach Verringerung des CO_2 -Partialdrucks

Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 13a; □—□—□ Übergang Luft+ 5% CO_2 auf Luft, ●—●—● Übergang Luft+ 5% CO_2 auf CO_2 -freie Luft, ○—○—○ Übergang Luft+ 5% CO_2 auf N_2

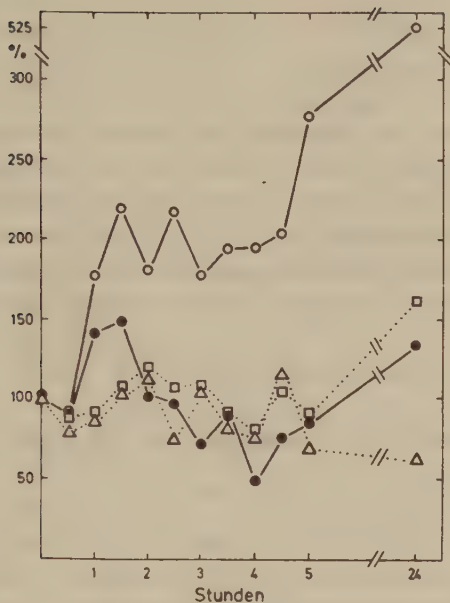


Abbildung 13 c Entwicklung der Enzymaktivitäten nach Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks von 0.035% auf 5%

12 Kulturen von *Chlorella fusca* wurden 4 Tage lang mit Luft begast. Nach Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks auf 5% wurde in halbstündigen Abständen je eine Kultur geerntet und die Enzymaktivitäten im Rohextrakt bestimmt: ●—●—● NAR, ○—○—○ NIR, □—□—□ GS, △—△—△ TSR.

100 % Aktivität entsprachen (in $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{h}$): NAR 3.57;

NIR 2.88; GS 108; TSR 0.37

Im entgegengesetzten Experiment, nach Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks von 0.035% auf 5%, zeigen die 3 Enzyme der Nitratsimilation ein ähnliches Verhalten: zunächst einen Anstieg innerhalb der ersten anderthalb bis zwei Stunden, dann eine Stagnation und über Nacht - d.h. nach den ersten 5 Stunden - einen

weiteren Anstieg. Auch in diesem Fall spiegelt die Nitritreduktase-Aktivität also nur bedingt den zeitlichen Verlauf der Nitritaufnahme.

Im Gegensatz zu den Enzymen des Nitratstoffwechsels zeigt die Thiosulfatreduktase zwar während der ersten 2 Stunden ebenfalls einen leichten Anstieg, danach aber eher fallende Aktivität.

Die hier dargestellten Ergebnisse lassen vermuten, daß es eine andere Primärursache für die Nitritausscheidung bzw. -aufnahme gibt und daß Veränderungen der Nitritreduktase-Aktivität nur ein sekundär zu beobachtendes Phänomen sind.

3.2.2 Enzymaktivitäten in Abhängigkeit von der S-Versorgung

3.2.2.1 Abhängigkeit der Enzymaktivitäten von der Sulfatkonzentration

Beim Wachstum von *Chlorella*-Kulturen mit unterschiedlichem - limitierendem - Sulfatangebot beobachtet man Nitritausscheidung in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration (vgl. 3.1.4.1). Um Aufschluß über das Enzymverhalten unter diesen Bedingungen zu erhalten, wurden Kulturen mit unterschiedlicher Ausgangskonzentration an Natriumsulfat nach fünftägigem Wachstum bei ausreichender CO₂-Versorgung (5%) geerntet und die Enzymaktivitäten bestimmt; die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Während die Thiosulfatreduktase-Aktivität mit zunehmendem Schwefelmangel steigt (nicht dargestellt), sinken alle Enzyme der Nitratassimilation ab. Am empfindlichsten ist die Nitritreduktase gegen Schwefelmangel: Bereits bei Verringerung auf die Hälfte der normalen Sulfatkonzentration sinkt ihre Aktivität auf 61% der Kontrolle.

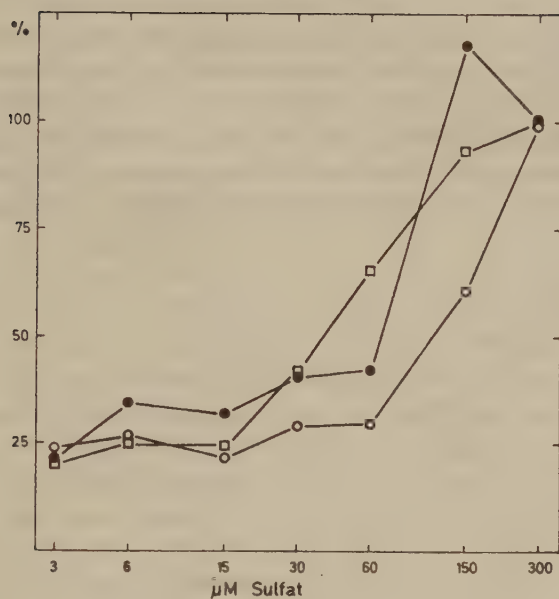


Abbildung 14 Enzymaktivitäten in S-Mangel-Kulturen

Aus *Chlorella*-Kulturen, die 5 Tage in Medium mit der jeweils angegebenen Sulfatkonzentration gewachsen und mit Luft + 5% CO₂ begast worden waren, wurden die Enzymaktivitäten bestimmt: ●—●—● NAR, ○—○—○ NIR, □—□—□ GS

100 % Aktivität entsprachen (in µmol/mg*h): NAR 2.96;

NIR 25.9; GS 116

3.2.2.2 Zeitlicher Verlauf der Nitritreduktase-Aktivität bei Sichtbar-Werden des S-Mangels

In Kulturen mit einer Ausgangskonzentration von 15 μM Natriumsulfat - d.h. 5% der normalen Sulfatkonzentration - wurde die Entwicklung der Nitritreduktase-Aktivität bei Einsetzen der Nitritausscheidung untersucht. Am dritten, vierten und fünften Tag nach dem Animpfen wurden vergleichend je eine sulfatlimitierte und eine normalversorgte Kultur geerntet. Während die

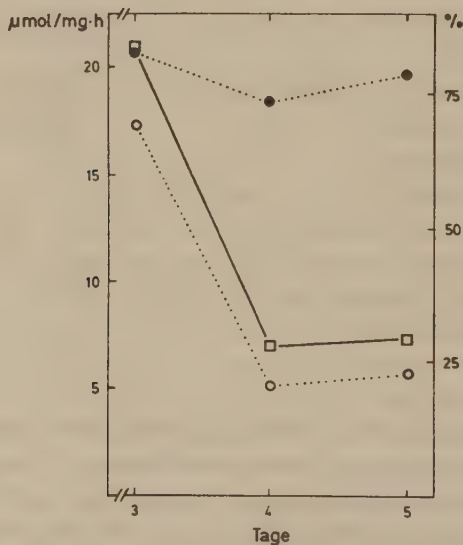


Abbildung 15 Veränderung der Nitritreduktase-Aktivität beim Eintreten von S-Mangel

Chlorella-Kulturen wuchsen bei Begasung mit Luft + 5% CO_2 in Standardmedium mit einer Ausgangskonzentration von 300 μM (Kontrolle; ●····●····●) bzw. 15 μM Sulfat (○····○····○). Am 3., 4. und 5. Tag wurde je eine Kultur geerntet und die Nitritreduktase-Aktivität im Rohextrakt bestimmt. Zusätzlich wurde die Aktivität der S-Mangel-Kultur prozentual zur Kontrolle berechnet (□—□—□).

Enzymaktivität der Kontrollkulturen in diesem Zeitraum unverändert bleibt, sinkt sie bei Schwefelmangel vom dritten auf den vierten Tag drastisch ab (Abbildung 15). Damit ergibt sich eine gute zeitliche Korrelation zwischen Absinken der Enzymaktivität und Einsetzen der Nitritausscheidung ins Medium (Abbildung 11).

3.3 Untersuchung einer nitritbindenden Komponente an *Chlorella*-Membranen

3.3.1 Grundsätzliche Eigenschaften

Die zeitlichen Diskrepanzen zwischen Nitritausscheidung bei CO₂-Limitierung einerseits und Veränderung der Nitritreduktase-Aktivität andererseits waren Ausgangspunkt für die Suche nach weiteren möglichen Kontrollstellen der Nitritreduktion bei *Chlorella*. Da Nitratreduktase (im Cytoplasma) und Nitritreduktase (im Chloroplasten) in Pflanzenzellen räumlich voneinander getrennt sind, könnte beim deshalb nötigen Transport des Nitrits in den Chloroplasten eine Regulation erfolgen.

Für die experimentelle Prüfung einer solchen Hypothese ergeben sich große Schwierigkeiten, da von Stickstoff kein handhabbares Isotop existiert. Die Bestimmung von Nitritaufnahmeraten erfolgt daher meist über Messung der O₂-Produktion bei der anschließenden Reduktion - damit geht aber immer die Aktivität der Nitritreduktase in die Messungen ein.

Außerdem lassen sich aus den meisten Grünalgen, so auch aus *Chlorella fusca*, keine intakten Chloroplasten präparieren. Da Hinweise vorlagen, daß manche *Chlorella* - Membranen Nitrit binden können, wurde zunächst untersucht, ob damit vielleicht ein indirekter Zugang zum oben skizzierten Problem möglich ist.

3.3.1.1 Experimenteller Ansatz

In einem bei pH 7.0 gepufferten Ansatz in Gegenwart von Nitrit, FMN, L-Cystein und Natriumdithionit wird durch *Chlorella* - Membranen Nitritreduktion mit Raten bis zu 10 mmol pro Milligramm Protein in der Stunde katalysiert. Dieser Ansatz ähnelt dem zur Bestimmung der Nitritreduktase (vgl. Tabelle 6), unterscheidet sich davon jedoch dadurch, daß

- Flavinnucleotide, z.B. FMN, als Elektronenüberträger höhere Reduktionsraten liefern als Methylviologen
- auch mit Natriumdithionit allein Reduktion erfolgt
- durch 1.5 mM Cystein eine Steigerung um Faktor 10 bis 100 bewirkt wird.

Rund 75% des nach der Inkubation nicht mehr nachweisbaren Nitrits wurden als Ammonium wiedergefunden. Außerdem entstehen signifikante Mengen an Stickstoffmonoxid (Abbildung 16).

Tabelle 6 Vergleich der Nitritreduktion durch Nitritreduktase und Membranfraktion

Ansatz	% Aktivität	
	Membran	Nitritreduktase
Dithionit/-	83.1	0
Dithionit/Methylviologen	81.9	90
Dithionit	100	0
ohne L-Cystein	6.8	100
ohne Dithionit	0	-

Die Ansätze entsprachen bis auf die jeweils angegebenen Unterschiede dem Standardansatz aus 2.4.3. und enthielten 69 µg (Membranfraktion) bzw. 61 µg (Nitritreduktase) Protein. 100 % Aktivität entsprachen 314 µmol/mg*h an der Membran bzw. 77 µmol/mg*h für die Nitritreduktase.

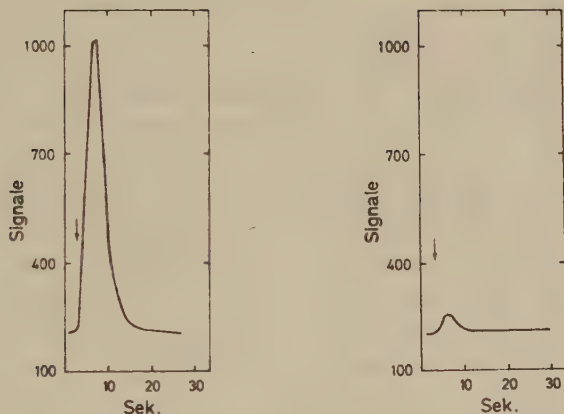


Abbildung 16 NO-Produktion bei der Membraninkubation

Ein Aliquot (80 µg Protein) einer Suspension von *Chlorella*-Membranen, die nach 2.1.3 erhalten worden waren, wurde - wie in 2.4.3 beschrieben - inkubiert und danach der NO-Gehalt der Gasphase im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Membranzusatz (rechts) bestimmt.

3.3.1.2 pH-Abhängigkeit der Meßreaktion

Die pH-Abhängigkeit der membrankatalysierten Nitritreduktion wurde sowohl im Basischen (mit Tris/HCl-Puffer) als auch im Sauren (mit Kaliumphosphatpuffer) untersucht (Abbildung 17). Ihr Optimum liegt deutlich im Neutralbereich; bei pH 8 bzw. pH 6 sind nur noch maximal 50% der Aktivität nachweisbar.

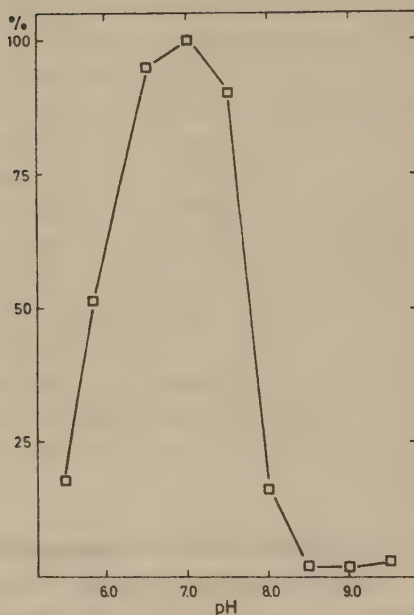


Abbildung 17 pH-Abhängigkeit der membrankatalysierten Nitritreduktion

Membransuspensionen von *Chlorella*, die 115 µg Protein enthielten, wurden in Ansätzen nach 2.4.3 inkubiert, und jeweils die Rate der Nitritreduktion als Differenz zu einer beim gleichen pH-Wert inkubierten Kontrolle berechnet. Im sauren Bereich wurde Kaliumphosphat- statt Trispuffer verwendet.

3.3.1.3 Hemmstoffwirkung auf die membrankatalysierte Nitritreduktion

Der Einsatz verschiedener Hemmstoffe sollte Hinweise auf die chemische Natur der beobachteten Reduktionsreaktion liefern.

Wie aus Tabelle 7 ersichtlich ist, ist die Reaktion außerordentlich empfindlich gegen Chelatoren und wird bereits durch 50 μM EDTA vollständig gehemmt.

Tabelle 7 Hemmstoffwirkung auf die membrankatalysierte Nitritreduktion

Hemmstoff	Konzentration	% Hemmung
EDTA	5 μM	0
	10 μM	14
	20 μM	44
	50 μM	100
Kaliumcitrat	10 mM	98
Natriumpyrophosphat	1 mM	13
	5 mM	39
	20 mM	99
Kaliumcyanid	20 μM	23
	40 μM	58
	60 μM	88
	100 μM	100
o-Phenanthrolin	1 mM	97
Salicylhydroxamsäure	1 mM	0
Natriumazid	5 mM	0

Ansätze nach 2.4.3 enthielten die Hemmstoffe in den jeweils angegebenen Konzentrationen und ein Aliquot der Membranfraktion mit 69 μg Protein. Die Nitritreduktion in der Kontrolle ohne Hemmstoffzusatz betrug 343.5 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{h}$.

3.3.1.4 Abhängigkeit von der Nitritkonzentration

Bei Einsatz unterschiedlicher Nitritkonzentrationen ergab sich eine lineare Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit bis 12 mM Nitrit (ohne Abbildung). Auch bei dieser - sicherlich unphysiologisch hohen - Konzentration ist die Reaktion nicht substrat-gesättigt.

3.3.1.5 Lokalisation der nitritbindenden Membrankomponente

Da aus *Chlorella* keine intakten Organellen isoliert werden können, wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Tischner (Göttingen) Membranbruchstücke aus *Chlorella sorokiniana*, die mittels Saccharose-Dichtegradient aufgetrennt waren (129), auf die nitritreduzierende Aktivität hin untersucht. Mit Hilfe dieser Technik konnte die Nitritreduktion an Chloroplastenmembranen lokalisiert werden (Abbildung 18). Es ergab sich jedoch eine reproduzierbare, geringfügige Verschiebung zwischen den Maxima von Chlorophyllabsorption und Nitritreduktion. Deshalb wurden an isolierten Erbsenchloroplasten Auftrennungen von Thylakoid- und Envelopemembranen durchgeführt, die eine eindeutige Zuordnung zur Envelopefraktion erlauben (Tischner, persönliche Mitteilung).

An gereinigten Präparationen innerer oder äußerer Envelopemembranen aus Erbsenchloroplasten, die freundlicherweise von Dr. Soll (Universität München) zur Verfügung gestellt wurden, war die Rate der Nitritreduktion zu niedrig, um eine eindeutige Zuordnung zu einer der beiden Membranen zu ermöglichen.

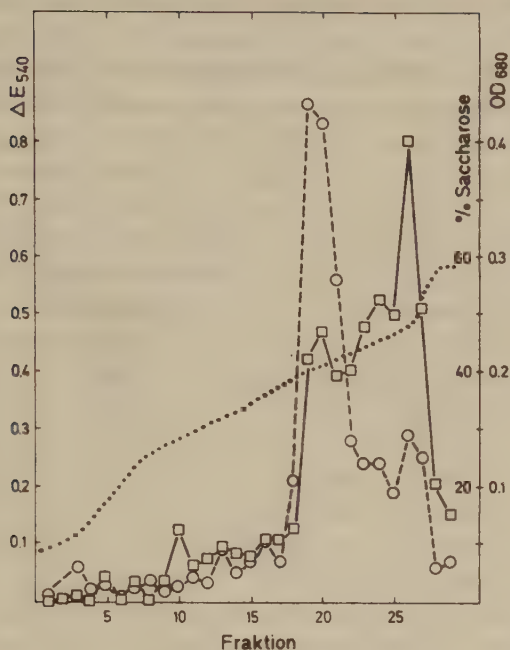


Abbildung 18 Lokalisation der nitritreduzierenden Komponente an Membranauftrennungen aus *Chlorella sorokiniana*
 Membranpräparationen von *Chlorella sorokiniana* wurden am Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt und auf nitritreduzierende Aktivität hin untersucht. Die Nitritreduktion ist als ΔE_{540} pro Inkubationsansatz dargestellt ($\square-\square-\square$) und zusätzlich der Chlorophyllgehalt als OD_{680} im Methanolextrakt ($O-O-O$); Saccharosegehalt.

3.3.2 Metallkatalysierte Nitritreduktion

3.3.2.1 Untersuchung verschiedener Metalle

Die Hemmung der Nitritreduktion an Membranen von *Chlorella* bereits in Gegenwart niedriger Chelator-Konzentrationen weist auf eine Beteiligung mehrwertiger Metallionen an der Reaktion hin.

Deshalb wurden verschiedene Metalle eingesetzt und geprüft, ob sie Nitritreduktion unter den Bedingungen der Reduktion durch *Chlorella* - Membranen katalysieren (Tabelle 8). Von allen untersuchten Metallen zeigt nur Eisen nennenswerte Nitritreduktion.

Tabelle 8a Nitritreduktion durch verschiedene Metallsalze

Salz	Konzentration	% Reduktion
FeCl ₃	10 µM	100
FeCl ₂	10 µM	102
Na ₂ MoO ₄	1 mM	0.9
CuCl ₂	100 µM	0
CoCl ₂	100 µM	0
MnCl ₂	100 µM	0
ZnCl ₂	100 µM	0

Die Reduktionsrate wurde in Ansätzen nach 2.4.3 bestimmt. Angegeben ist jeweils die höchste von mehreren eingesetzten Metallkonzentrationen. 100 % Reduktion entsprechen 801 µmol NO₂⁻/µmol Metall * h.

Tabelle 8b Nitritreduktion durch metallhaltige Proteine

Protein	Nitritreduktion (µmol/mg*h)
Cytochrom c	2.4
Ferredoxin	53.6
Chlorella-Membran	343.5
Synechococcus-Membran	529.0

Die nitritreduzierende Aktivität wurde in Ansätzen nach 2.4.3 bestimmt, die *Chlorella*-Membranen mit 69 µg Protein, *Synechococcus* - Membranen mit 37 µg Protein bzw. 150 µg Cytochrom c oder 41.2 µg Ferredoxin (aus Spinat) enthielten.

3.3.2.2 Eigenschaften der Eisen-katalysierten Nitritreduktion

Die durch 10 μM FeCl_3 katalysierte Nitritreduktion wurde bezüglich pH-Abhängigkeit (Abbildung 18), Hemmbarkeit (Tabelle 9) und NO-Produktion (Abbildung 20) mit der an *Chlorella* - Membranen ablaufenden Reaktion verglichen. Es ergab sich eine grundlegende Übereinstimmung beider Reaktionen.

Tabelle 9 Hemmstoffwirkung auf die Eisen-katalysierte Nitritreduktion

Hemmstoff	Konzentration	% Hemmung	
		Membran	Fe^{3+}
EDTA	5 μM	0	17
	10 μM	14	51
	20 μM	44	100
	50 μM	100	100
Kaliumcitrat	10 mM	98	100
Natriumpyrophosphat	1 mM	13	9
	5 mM	39	48
	20 mM	99	100
Kaliumcyanid	20 μM	23	34
	40 μM	58	82
	60 μM	88	98
o-Phenanthrolin	1 mM	97	100
Salicylhydroxamsäure	1 mM	0	3
Natriumazid	5 mM	0	0

Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 7. Die Eisen-katalysierte Nitritreduktion wurde in Ansätzen mit 10 μM FeCl_3 untersucht; 100 % Aktivität entsprachen hier 822 $\mu\text{mol}/\mu\text{mol}\cdot\text{h}$.

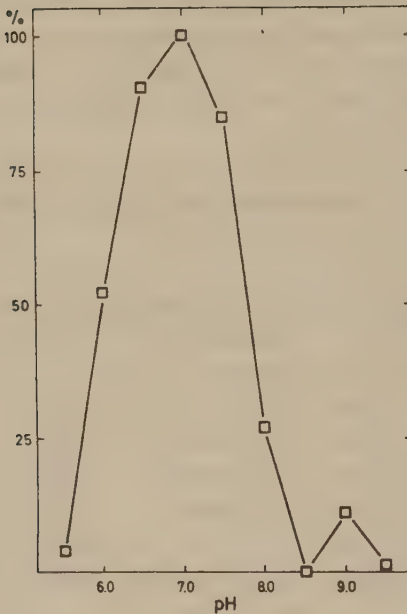


Abbildung 19 pH-Abhängigkeit der Fe^{3+} -katalysierten Nitritreduktion

Experimentelle Bedingungen wie in Abbildung 17. Die Ansätze enthielten 20 nmol FeCl_3 .

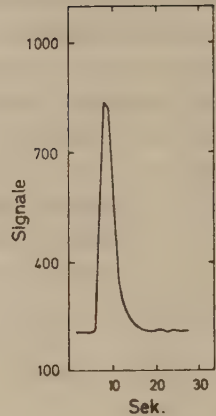


Abbildung 20 NO-Produktion bei der Nitritreduktion
Experimentelle Bedingungen wie in Abbildung 16. Die Ansätze enthielten 200 nmol FeCl_3 .

3.4 Abhängigkeit der membrankatalysierten Nitritreduktion von den Wachstumsbedingungen

Für die folgenden Experimente wurde davon ausgegangen, daß

1. die Nitritreduktion an *Chlorella* - Membranen eine Nitritbindung an den Membranen voraussetzt und die Rate der Nitritreduktion mit der Nitritbindekapazität korreliert ist;

2. wenn die so meßbare Nitritbindekapazität der Membranen in irgendeiner Weise mit der Nitritausscheidung unter Nährstoffmangel zusammenhängt, sie sich unter den Mangelbedingungen entsprechend ändern muß.

3.4.1 Abhängigkeit von der C-Versorgung

3.4.1.1 Einfluß der CO₂-Konzentration

Parallel zu den Enzymen der Nitratreduktion (vgl. 3.2.1.1) wurde auch die membrangebundene Nitritreduktionsrate bei Begasung mit 0.035% (Luft) und 5% CO₂ verglichen; ihr sind in Tabelle 10 noch einmal die Enzymaktivitäten unter den jeweiligen Bedingungen gegenübergestellt. Wie die Enzymaktivitäten ist auch die Nitritreduktion an der Membranfraktion bei Luftbegasung gegenüber ausreichender CO₂-Versorgung erniedrigt.

Tabelle 10 Enzymaktivitäten und membrankatalysierte Nitritreduktion bei unterschiedlichem CO₂-Partialdruck

	µmol/mg*h	
	Luft + 5% CO ₂	Luft
Nitratreduktase	3.4	2.6
Nitritreduktase	20.1	1.9
Glutaminsynthetase	80.4	60.2
Thiosulfatreduktase	0.21	0.24
Membranreaktion	973	177

Experimentelle Bedingungen s. Tabelle 5. Die membrankatalysierte Nitritreduktion wurde nach 2.4.3 bestimmt.

3.4.1.2 Verhalten der Reduktionsrate nach Veränderung der CO₂-Konzentration

Der Verlauf der membrankatalysierten Reduktionsrate innerhalb der ersten Stunden nach Veränderung des CO₂-Partialdrucks ist in Abbildung 21 wiedergegeben (entsprechend Abbildung 13 für die Enzymdaten).

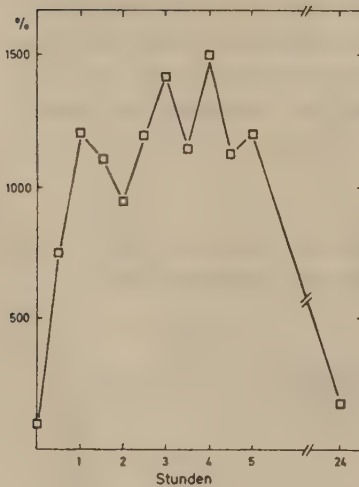


Abbildung 21a

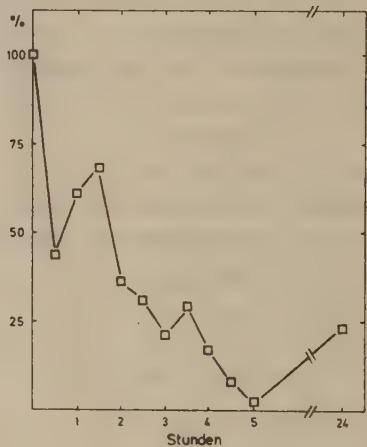


Abbildung 21b

Verhalten der membrankatalysierten Nitritreduktion nach Veränderung des CO₂-Angebots.

Die Rate der Nitritreduktion an *Chlorella*-Membranen wurde nach Erhöhung des CO₂-Partialdrucks von 0.035 % auf 5 % (Abb. 21a) und nach Wechsel von Luft + 5% CO₂ auf CO₂-freie Luft (Abb. 21b) gemessen. Bedingungen wie in Abb. 13. 100 % Aktivität entsprachen 7.4 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{h}$ in Abb. 21a und 31.2 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{h}$ in Abb. 21b.

Bei Erhöhung des CO_2 -Gehalts auf 5% beobachtet man - einsetzend bereits nach 30 Minuten - ein Ansteigen der Nitritreduktion. Der Gesamtverlauf während der ersten 5 Stunden zeigt eine Optimumskurve mit maximaler Rate nach 4 Stunden (Abbildung 21a).

Auch bei Verringerung des CO_2 -Partialdrucks werden nach 30 Minuten erste Veränderungen der membrankatalysierten Reduktion sichtbar (Abbildung 21b). Abgesehen von relativ großen Aktivitätsunterschieden zwischen den einzelnen Kulturen nimmt die Rate der Nitritreduktion an der Membranfraktion allmählich ab. Dabei treten - ähnlich wie bei den Enzymmessungen im gleichen Experiment - keine grundsätzlichen Unterschiede auf, wenn die CO_2 -Konzentration von 5% auf die 0.035% der Luft oder auf Null (CO_2 -freie Luft oder Stickstoff-Begasung) herabgesetzt wird.

Die Veränderung der membrankatalysierten Nitritreduktion ist die einzige bisher im *Chlorella* - Aufschluß gefundene schnell - d.h. innerhalb von einer Stunde - einsetzende Reaktion auf Veränderungen der CO_2 -Versorgung.

3.4.2 Einfluß der S-Versorgung

3.4.2.1 Reduktionsraten bei unterschiedlicher Sulfatausgangskonzentration

Bei unterschiedlich stark ausgeprägtem Sulfatmangel ergibt sich für die Membranreaktion das in Abbildung 22 dargestellte Bild. Im Gegensatz zu den Enzymen der Nitratassimilation (vgl. Abbildung 14) steigt die Rate mit zunehmendem Sulfatmangel an.

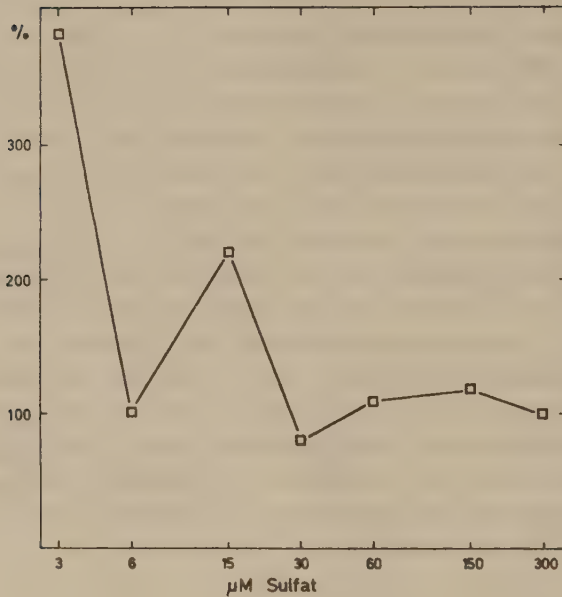


Abbildung 22 Membrankatalysierte Nitritreduktion in S-Mangel-Kulturen

In den Membranfraktionen der Kulturen aus Abb. 14 wurde die Nitritreduktion gemessen (100 % = 1 118 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{h}$).

3.4.2.2 Aktivitätsverlauf bei Eintreten des S-Mangels

In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis steht der zeitliche Verlauf der Membranaktivität bei Sichtbarwerden des Sulfatmangels (Abbildung 23). Bei Schwefelmangel wie bei ausreichender Nährstoffversorgung geht die Aktivität vom 3. Tag des Wachstums (an dem der physiologische Zustand der beiden Kulturen offensichtlich noch fast gleich ist) auf den 4. Tag stark zurück. Dieser Rückgang ist jedoch in den Kontrollkulturen stärker ausgeprägt als bei den Sulfatmangel-Kulturen, so daß in diesen die Rate

der membrangebundenen Nitritreduktion am 4. und 5. Tag um den Faktor 2 bis 4 höher liegt.

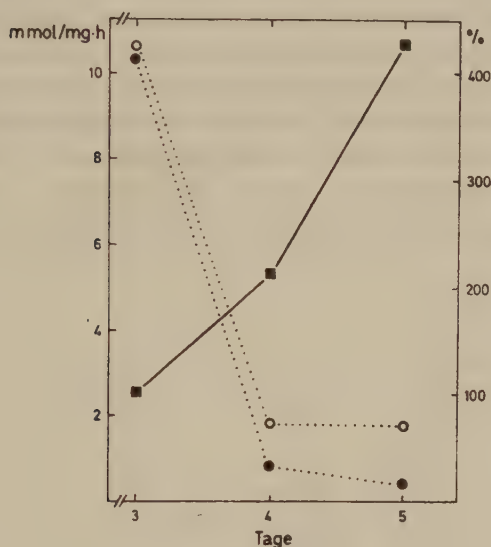


Abbildung 23 Verlauf der membrankatalysierten Nitritreduktion bei Eintritt des S-Mangels

Dargestellt ist die Rate der Nitritreduktion in den Membranfraktionen der Kulturen aus Abb. 15. ●—●—● Sulfatkontrolle, ○—○—○ S-Mangel, ■—■—■ S-Mangel in % der Kontrolle

3.4.3 Einfluß der N-Versorgung

Um über die bisher beschriebenen Korrelationen zur Nitritauscheidung bzw. -aufnahme hinaus Anhaltspunkte dafür zu erhalten, ob die an Membranen gefundene Komponente am Nitratstoffwechsel beteiligt sein kann, wurde ihr Verhalten bei Veränderung der Stickstoffversorgung mit dem Enzymverhalten unter diesen Bedingungen verglichen.

3.4.3.1 Abhängigkeit von der Nitratkonzentration

Die nach fünftägigem Wachstum mit unterschiedlicher Ausgangskonzentration an Nitrat (genaue experimentelle Bedingungen s. "Methoden") erhaltenen Daten sind in Abbildung 24 dargestellt. Wie alle Enzymaktivitäten - einschließlich Thiosulfatreduktase - steigt die membrankatalysierte Rate der Nitritreduktion bei zunehmendem Stickstoffmangel an; bei sehr ausgeprägtem Defizit zeigt sich hier allerdings ein Rückgang der Aktivität.

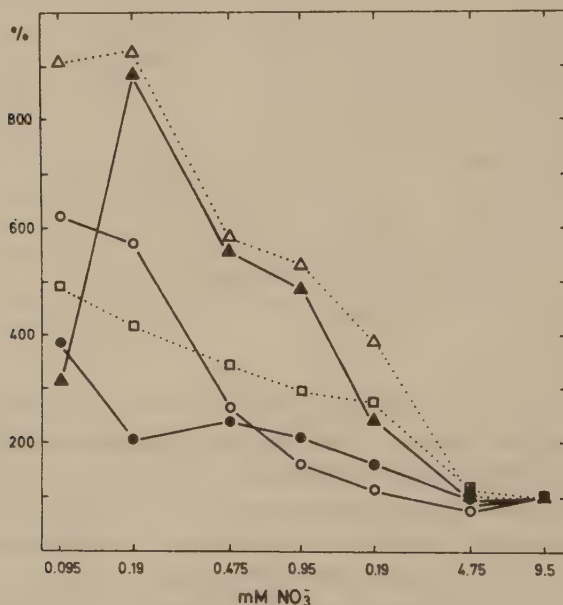


Abbildung 24 Enzymaktivitäten und membrankatalysierte Nitritreduktion in N-Mangel-Medium

Chlorella-Kulturen wurden in Medium mit der jeweils angegebenen Nitratkonzentration und bei 5% CO₂ gezogen. Nach 5tägigem Wachstum wurden die Kulturen geerntet und die Aktivitäten in Rohextrakt und Membranfraktion gemessen: ●—●—● NAR, ○—○—○ NIR, □—□—□ GS, △—△—△ TSR, ▲—▲—▲ Membran. 100% entspricht (in $\mu\text{mol}/\text{mg}\cdot\text{h}$): NAR 3.24; NIR 22.4; GS 75.4; TSR 0.34; Membranfraktion 504.

3.4.3.2 Aktivität in Ammonium-haltigem Medium

Bei Verwendung von Ammonium statt Nitrat als einziger oder zusätzlicher Stickstoffquelle im Nährmedium sinkt die Aktivität der Nitrat- und Nitritreduktase deutlich ab. Die Rate der membrankatalysierten Reduktion verringert sich auf die Hälfte (Abbildung 25). Deutlicher ausgeprägt ist dieses Verhalten in synchronisierten Kulturen von *Chlorella sorokiniana*; nach 2 Generationen langem Wachstum auf Ammonium ist hier die Membrankomponente - ebenso wie die beiden Reduktasen (167) - nicht mehr nachweisbar (Tischner, persönliche Mitteilung).

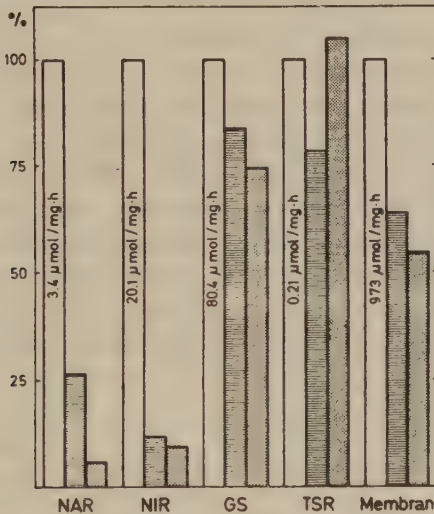


Abbildung 25 Enzymaktivitäten und membrankatalysierte Nitritreduktion bei unterschiedlichen N-Quellen

Chlorella fusca wuchs vor dem Ernten 5 Tage bei Begasung mit Luft + 5% CO₂ in Medium, das als N-Quelle 8 mM KNO₃ (leere Balken), je 8 mM KNO₃ und NH₄Cl (schraffierte Balken) oder 8 mM NH₄Cl (gepunktete Balken) enthielt.

3.5 Versuche zum Nitritstoffwechsel bei *Synechococcus* 6301

Nitritausscheidung unter CO_2 -Mangel - gemessen bei Luftbegasung oder völligem CO_2 -Ausschluß - ist neben den hier für *Chlorella fusca* dargestellten Ergebnissen auch bei anderen Grün- und Blaualgen beobachtet worden. Durch Versuche mit der Blaualge *Synechococcus* 6301 wurde geprüft, ob sich die bei der genaueren Untersuchung an *Chlorella* - Kulturen aufgetretenen Phänomene auch bei Prokaryonten zeigen.

3.5.1 Nitritausscheidung unter C-Mangel

3.5.1.1 Nitritausscheidung bei Luftbegasung

Eine Wachstumskurve von *Synechococcus* bei Begasung mit Luft im Dauerlicht ist in Abbildung 26 dargestellt: Auch in *Synechococcus*-Kulturen setzt bei einer gewissen Algendichte Nitritausscheidung ohne gleichzeitige Ammoniumausscheidung ein. Die dabei gemessenen Nitritkonzentrationen bleiben immer unter 1 mM und sind damit deutlich niedriger als bei *Chlorella*.

Bei Begasung mit Luft + 5% CO_2 scheidet *Synechococcus* kein Nitrit aus. Nach Verringerung des CO_2 -Partialdrucks vergehen oft mehrere Stunden bis erstmals Nitrit ausgeschieden wird (nicht dargestellt).

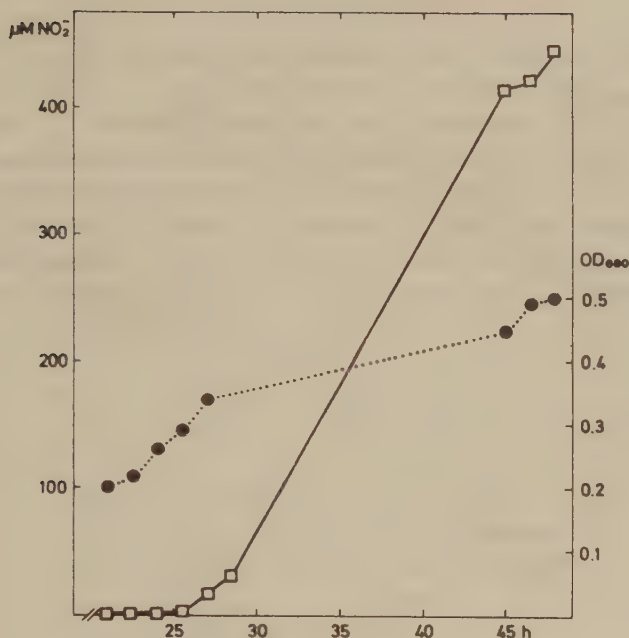


Abbildung 26 Wachstum von *Synechococcus* 6301 bei Begasung mit Luft

Der Verlauf von OD_{680} (●—●—●) und Nitritgehalt (□—□—□) in einer luftbegasten *Synechococcus*-Kultur sind dargestellt.

3.5.1.2 Einfluß des pH-Wertes auf die Nitritausscheidung

Wird durch Pufferung des Kulturmediums mit 20 mM MOPSO/KOH der pH-Wert auch bei Luftbegasung im Neutralbereich gehalten, so beobachtet man, daß in den gepufferten Kulturen Wachstum (nicht dargestellt) und Nitritausscheidung (Abbildung 27) gegenüber Kontrollkulturen beschleunigt sind. Wiederum wurde an einer MOPSO-gepufferten, mit 5% CO_2 -begasten Kultur abgesichert, daß nicht die Puffersubstanz selbst die beschleunigte Nitritausscheidung bewirkt.

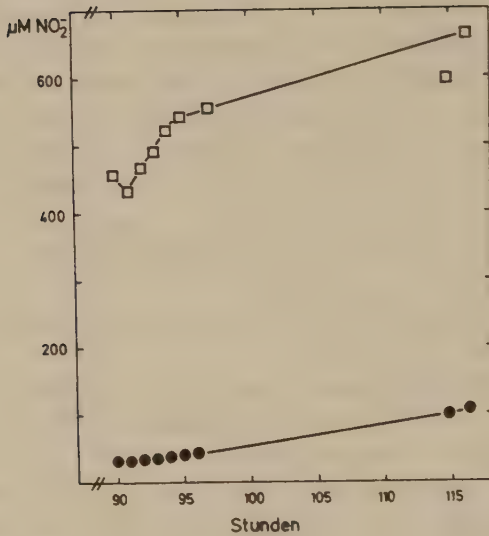


Abbildung 27 Nitritausscheidung in Abhängigkeit vom pH-Wert

Der Verlauf der Nitritexkretion durch *Synechococcus* bei Begasung mit Luft ohne CO₂-Zusatz wurde in einer Kultur mit Standardmedium (●-●-●) und in einer Kultur, in der das Medium durch 20 mM MOPSO/KOH bei pH 7 gepuffert war (□-□-□) gemessen.

3.5.1.3 Einfluß von Ammoniumzugabe auf die Nitritausscheidung

Beschleunigte Nitritexkretion findet man auch, wenn luftbegassten Kulturen beim Animpfen reduzierter Stickstoff in Form von Ammoniumchlorid zugesetzt wird (ohne Abbildung). Harnstoff-Zusatz hat dagegen keine Auswirkung auf die Nitritausscheidung.

3.5.2 Nitritaufnahme bei hohem CO_2 -Angebot

3.5.2.1 Nitritaufnahme nach Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks

Wird für luftbegaste *Synechococcus*-Kulturen im Stadium der Nitritausscheidung der CO_2 -Partialdruck auf 5% erhöht, so beobachtet man langfristig Nitritaufnahme (Abbildung 28). Analog zu dem Verhalten bei Verringerung der CO_2 -Konzentration setzt die Nitritaufnahme oft jedoch erst nach mehreren Stunden ein. Auch in diesem Stadium mißt man keine Ammoniumausscheidung.

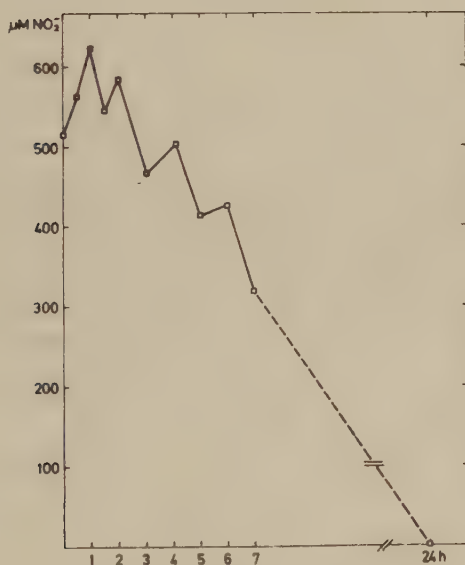


Abbildung 28 Nitritaufnahme nach Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks

Nachdem eine *Synechococcus*-Kultur 4 Tage mit Luftbegasung gewachsen war, wurde der CO_2 -Partialdruck auf 5% erhöht und die Nitritaufnahme durch die Algen gemessen.

3.5.2.2 Nitritaufnahme bei langfristig hohem CO_2 -Partialdruck

Vergleicht man die allmähliche Nitritaufnahme nach Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks (Abbildung 28) mit der Nitritaufnahme in bereits langfristig CO_2 -gesättigten Kulturen (Abbildung 29), so ergibt sich ein wesentlicher Unterschied: Nitritzugabe zu solchen Kulturen bewirkt rasch (innerhalb von 5 Minuten) einsetzende Ammoniumausscheidung; dieses wird im Medium angehäuft und erst wieder aufgenommen, nachdem sämtliches Nitrit im Medium umgesetzt ist.

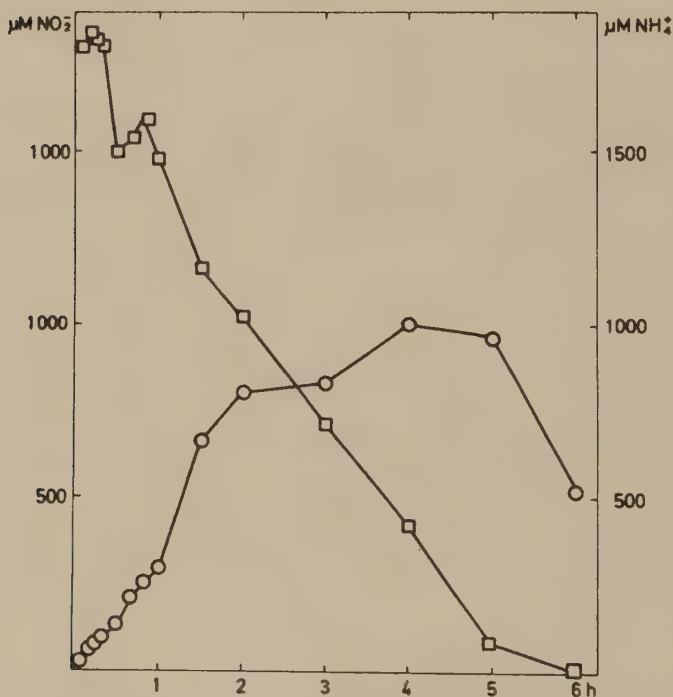


Abbildung 29 Nitritaufnahme durch CO_2 -gesättigte Kulturen
Synechococcus-Kulturen wuchsen 3 Tage lang bei Begasung mit Luft + 5% CO_2 , bevor 2 mM NaNO_2 zugesetzt und der Verlauf von Nitrit- ($\square-\square-\square$) und Ammoniumkonzentration ($\circ-\circ-\circ$) im Medium gemessen wurde.

3.5.3 Nitritausscheidung bei S-Mangel

3.5.3.1 Wachstum in sulfatfreiem Medium

Durch das verhältnismäßig große Animpfvolumen (2 ml der Stammkulturen) erhalten *Synechococcus*-Kulturen einen Sulfatvorrat (etwa 45 μM), der offensichtlich auch in ansonsten sulfatfreiem Medium für etwa zweitägiges Wachstum frisch angeimpfter Kulturen ausreichend ist. Danach beobachtet man eine relativ rasche Farbänderung der Kulturen von blaugrün nach gelbgrün; etwa gleichzeitig kann man trotz Begasung mit 5% CO_2 erstmals Nitrit im Medium nachweisen (Abbildung 30).

3.5.3.2 Einfluß von reduzierten N-Verbindungen auf die Nitritausscheidung

Der Einfluß von reduziertem Stickstoff auf die Nitritausscheidung durch *Synechococcus* unter Sulfatmangel ist in Abbildung 30 dargestellt. Gegenwart von 1 mM Ammoniumchlorid oder 2 mM Harnstoff bereits beim Animpfen verhindert Nitritausscheidung während fünftägigem Wachstum. Bei späterer Zugabe (wenn bereits Nitrit ausgeschieden wird) hat nur noch Ammoniumzugabe einen Einfluß: Es bewirkt fast sofortigen Stillstand der Nitritexkretion; die Nitritkonzentration im Medium bleibt auch im weiteren Verlauf unverändert.

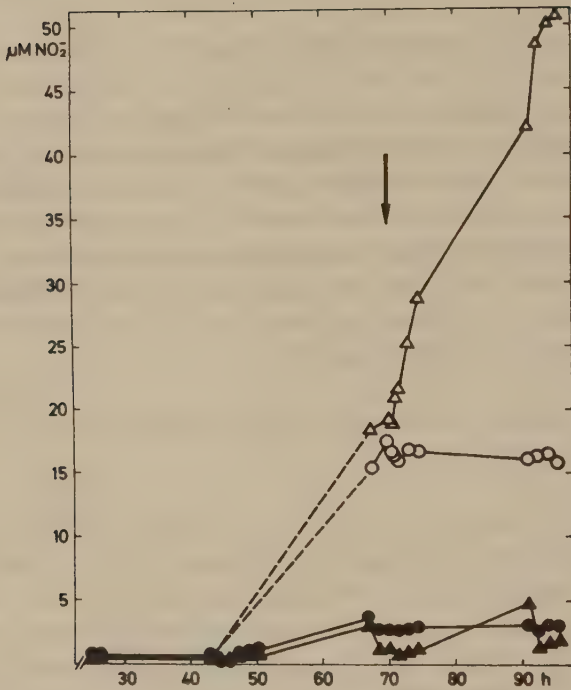


Abbildung 30 Nitritausscheidung bei S-Mangel und ihre Hemmbarkeit durch reduzierte N-Quellen

Synechococcus wurde in sulfatfreiem Medium angeimpft und mit Luft + 5% CO₂ gezogen. Bei Versuchsbeginn (●—●, ▲—▲) oder nach Einsetzen der Nitritausscheidung (○—○, △—△) wurde 1 mM NH₄Cl (●—●, ○—○) bzw. 2 mM Harnstoff (▲—▲, △—△) zugegeben.

3.5.4 Nitritaufnahme bei verschiedenen S-Quellen

Zu Sulfatmangel-Kulturen wurden nach zweitägigem Wachstum verschiedene Schwefelquellen zugegeben und ihre Auswirkung auf den Nitritgehalt des Mediums untersucht (Tabelle 11).

Tabelle 11 Wirkung verschiedener S-Quellen auf das Wachstum von *Synechococcus* in S-Mangel-Medium

S-Quelle	Nitrit im Medium	Farbe
Kontrolle Sulfat	-	dunkelgrün
S-Mangel	+	gelb
nach Nitritausscheidung Zugabe von:		
L-Cystein	+	gelb
Glutathion (reduziert)	-	grün
Natriumthiosulfat	-	grün
Mercaptoessigsäure	-	gelb

Die Kulturen wuchsen bei Begasung mit Luft + 5% CO₂ für 50 h in S-Mangel-Medium (bis auf die Sulfatkontrolle) bis Nitritausscheidung eingesetzt hatte. Danach wurden die angegebenen S-Quellen in 0.3 mM Konzentration zugegeben. Der Befund 19 h nach der Zugabe ist in der Tabelle festgehalten.

Es wurden Natriumsulfat, Natriumthiosulfat, L-Cystein, reduziertes Glutathion und Mercaptoessigsäure eingesetzt. Während der ersten 4.5 Stunden nach der Zugabe beobachtet man weitere Nitritausscheidung; nach 19 Stunden hatten bis auf L-Cystein alle oxidierten und reduzierten Schwefelverbindungen vollständige Nitritaufnahme ermöglicht. In der L-Cystein-Kultur wurde lediglich ein geringfügiger Rückgang der Nitritkonzentration gemessen. Auffallend ist, daß Mercaptoessigsäure offensichtlich den Sulfatmangel nicht völlig beheben kann, da die Algen weiterhin gelblich gefärbt sind (Tabelle 11); trotzdem wurde das zuvor ausgeschiedene Nitrit vollständig aufgenommen.

3.5.5 Untersuchung auf die nitritreduzierende Membrankomponente

3.5.5.1 Nachweis und grundsätzliche Eigenschaften

Da *Synechococcus* in Bezug auf Nitritausscheidung und -aufnahme ein ähnliches Verhalten zeigt wie *Chlorella fusca*, wurde untersucht, ob er die nitritreduzierende Membrankomponente besitzt, die für *Chlorella* in Zusammenhang mit dem Nitritstoffwechsel gebracht werden kann. Auch an *Synechococcus*-Membranen wird im entsprechenden Ansatz Nitrit reduziert und in den grundsätzlichen Eigenschaften stimmen beide Reaktionen überein (Tabelle 12).

Tabelle 12 Hemmstoffwirkung auf die membrankatalysierte Nitritreduktion bei *Chlorella* und *Synechococcus*

Hemmstoff	Konzentration	% Hemmung	
		<i>Chlorella</i>	<i>Synechococcus</i>
EDTA	10 μM	14	30
	50 μM	100	100
Kaliumcitrat	10 mM	98	100
Natriumpyrophosphat	1 mM	13	29
	20 mM	99	100
Kaliumcyanid	20 μM	23	35
	40 μM	58	85
	100 μM	100	100
o-Phenanthrolin	1 mM	97	100
Natriumazid	5 mM	0	2

Experimentelle Bedingungen wie in Tabelle 7. An der *Synechococcus*-Membran, von der jeweils ein Aliquot mit 37 μg Protein eingesetzt wurde, entsprachen 100 % Aktivität 529 $\mu\text{mol/mg}\cdot\text{h}$.

3.5.5.2 Abhängigkeit von den Wachstumsbedingungen

Um mögliche Veränderungen von Nitritreduktase und nitritreduzierender Membrankomponente unter Mangelbedingungen zu untersuchen, wurden unterschiedlich alte *Synechococcus*-Kulturen mit verschiedenen Wachstumsbedingungen geerntet und die jeweiligen Aktivitäten gemessen. Eine Kontrolle war jeweils in Normalmedium gewachsen und mit Zusatz von 5% CO₂ begast worden; eine Kultur mit Normalmedium war durch Luftbegasung CO₂-limitiert, eine dritte Kultur wurde in sulfatfreiem Medium bei Begasung mit 5% CO₂ gezogen. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Tabelle 13 dargestellt. In allen Mangelkulturen ist die Nitritreduktase gegenüber den Kontrollen verringert; die Membranreaktion ist in den Mangelkulturen - bis auf eine Ausnahme - erhöht.

Tabelle 13 Nitritreduktion durch Nitritreduktase und Membranfraktion bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen

Bedingungen		Nitritreduktase		Membranreaktion	
		µmol/mg*h	%	µmol/mg*h	%
Versuch 1 (3 Tage alt)	Kontrolle	5.8	100	105.3	100
	Luft	0.56	10	167.8	159
	- S	0.46	8	29.6	28
Versuch 2 (4 Tage alt)	Kontrolle	4.5	100	102.4	100
	Luft	2.2	49	455.9	445
	- S	2.0	44	574.2	561
Versuch 3 (5 Tage alt)	Kontrolle	5.1	100	46.8	100
	Luft	1.9	37	589.1	1259
	- S	0.48	9	239.1	511

Synechococcus-Kulturen wuchsen für die angegebene Zeit in Normalmedium (Kontrolle, Luftkultur) bzw. S-Mangel-Medium und wurden mit Luft bzw. Luft + 5% CO₂ (Kontrolle, S-Mangel-Kultur) begast.

4 Diskussion

Seit längerer Zeit ist bekannt, daß Algen unter bestimmten Bedingungen, die mehr oder weniger stark von den natürlichen Wachstumsbedingungen unterschieden sind, Zwischenprodukte der Nitratassimilation, nämlich Nitrit und Ammonium in das umgebende Medium ausscheiden.

Frühe Beobachtungen dazu stammen von Kessler (87), der bei verschiedenen Algen in Nitratmedium Nitritanhäufung bei sauren pH-Werten fand. Die obere pH-Grenze für die Nitritausscheidung variierte für verschiedene Arten zwischen pH 2 und pH 7, die untere Grenze war durch die pH-Toleranz der einzelnen Arten und die hohe Toxizität von Nitrit im Sauren gegeben. Kessler führte die Nitritanhäufung auf eine pH-abhängige Hemmung der Nitritreduktion bei gleichzeitiger Steigerung der Nitratreduktion zurück (86).

Unabhängig davon beobachtete er, daß Algen in ATP-Mangelzuständen Nitrit ausscheiden, nämlich in Dunkelansätzen unter anaeroben Bedingungen oder in der Gegenwart von Entkopplern (87, 88, 90). Die daraus abgeleitete Energieabhängigkeit der Nitritreduktion konnte in belichteten Ansätzen nicht bestätigt werden (89, 116). Spätere Untersuchungen ergaben, daß Nitrat- und Nitritreduktion durch Entkoppler im Dunkeln - und weniger ausgeprägt auch im Licht - gehemmt werden; die Nitritanhäufung spiegelt lediglich die Tatsache wieder, daß die Nitritreduktion empfindlicher als die Nitratreduktion reagiert (2). Eine mögliche Erklärung für die Energieabhängigkeit ergab sich mit der Entdeckung, daß der Ammoniumeinbau in Pflanzen in der Regel über die Enzymsequenz Glutaminsynthetase/Glutamatsynthase (GOGAT) erfolgt. Wenn die Geschwindigkeit des NH_4^+ -Einbaus die Nitratreduktion reguliert (35), könnte die ATP-Abhängigkeit der Glutaminsynthetase indirekt die Energieabhängigkeit der Reduktion bewirken.

Als weiterer wesentlicher Faktor für eine vollständige Assimilation von Nitrat erwies sich eine ausreichende Kohlenstoffversorgung der Algen. Erste Anhaltspunkte dafür kamen aus Experimenten zur Bestimmung der photosynthetischen Natur der Nitratreduktion. In diesen Versuchen, in denen meist dichte Al-

gensuspensionen unter N_2 -Atmosphäre (um gleichzeitige CO_2 -Reduktion auszuschließen) inkubiert wurden, häuften sich Nitrit und besonders Ammonium im Medium an (42,172). Diese Anhäufung wurde auf das Fehlen von Kohlenstoff-Skeletten für den Einbau von Ammonium zurückgeführt (97).

Kohlenstoffmangelbedingungen, die zur Nitrit- bzw. Ammoniumausscheidung führen, können jedoch auch während des Algenwachstums in luftbegasten Kulturen auftreten, soweit der CO_2 -Gehalt der Luft nicht deutlich erhöht wird (6,8).

Auch die bei Blaualgen als Folge von Natriummangel beobachtete Nitritausscheidung (22) scheint indirekt mit der Kohlenstoffversorgung zusammenzuhängen. Denn unter anderem bei *Anabaena* wurde gezeigt, daß die Fähigkeit zur Aufnahme von anorganischem Kohlenstoff über die Natriumversorgung gesteuert wird (1,83,145).

Von anderen Nährelementen gibt es kaum Untersuchungen zur Auswirkung auf die Nitritassimilation. Experimente mit Phosphatmangel bei *Chlorella* führten zu uneinheitlichen Ergebnissen, die stark von den Rahmenbedingungen abhingen (110).

Erstaunlicherweise fehlten bisher Untersuchungen über die Bedeutung der Schwefelversorgung. Dabei kommt dem Schwefel in zweierlei Hinsicht neben Kohlenstoff eine - zwar nicht quantitativ, aber qualitativ - gleichrangige Bedeutung zu:

1. Schwefel ist ebenfalls Proteinbestandteil.
2. Die häufigste Schwefelquelle ist Sulfat; dieses muß vor dem Einbau reduziert werden, wofür wie bei der Assimilation von CO_2 und Nitrat Reduktionsäquivalente und Energie benötigt werden, so daß eine gegenseitig regulierte Reduktion dieser 3 Elemente anzunehmen ist.

Im Gegensatz zu den vielfältigen Auslösern der Nitritausscheidung bei Algen ist sie für höhere Pflanzen (gemessen an inkubierten Blättern oder Wurzeln) nur unter anaeroben Bedingungen im Dunkeln beschrieben worden (78,119,120,178).

4.1 Nitritstoffwechsel bei *Chlorella* unter S-Mangel

Im Gegensatz zu Kontrollkulturen in Standardmedium, in denen man bei Begasung mit Luft + 5% CO_2 keinerlei Nitrit findet,

setzt in sulfatlimitierten Kulturen nach einigen Tagen Nitrit-exkretion ein. Die Tatsache, daß unter Sulfatmangelbedingungen angeimpfte *Chlorella* - Kulturen um so eher Nitrit ausscheiden je niedriger die Sulfatausgangskonzentration war (Abbildung 11) und daß bis zur ersten Nitritausscheidung immer Tage vergehen (selbst bei einer Ausgangskonzentration von nur 6 μ M Natriumsulfat) weist darauf hin, daß die Algen zunächst das vorhandene Sulfat vollständig verwerten, bevor anschließend eine Umsteuerung einsetzt, die schließlich zur Nitritausscheidung führt. Diese Umsteuerung ist ihrerseits kein sehr rascher Prozeß: Auch nach Umwaschen 4 Tage alter Kulturen in sulfatfreies Medium vergehen etwa 6 Stunden, bevor Nitrit ins Medium abgegeben wird. Dieser Zeitraum ist deutlich länger als die 2 bis 2.5 Stunden, in denen der Sulfatpool von *Chlorella fusca* so weit sinkt, daß erste Sulfatmangel-Symptome - wie Sulfonataufnahme und erhöhte Sulfataufnahme - sichtbar werden (16).

Erst später und in kleineren Mengen als Nitrit wird von *Chlorella* auch Ammonium ausgeschieden. Offensichtlich kann dieses zunächst auch unter Schwefelmangel noch quantitativ in Proteine oder Speicherverbindungen eingebaut werden. Das später ausgeschiedene Ammonium könnte statt direkt aus der Nitratreduktion auch aus Proteinabbau zur S-Mobilisierung stammen. Ein Ursprung auch des Nitrits aus diesem Weg scheint ausgeschlossen, da *Chlorella* dann Ammonium - zumindest unter S-Mangel-Bedingungen - zu Nitrit oxidieren müßte. Dem widerspricht, daß S-Mangelkulturen, die mit Ammonium statt Nitrat als N-Quelle wachsen, kein Nitrit ausscheiden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Grundsätzlich könnte die Ausscheidung von Nitrit darauf beruhen, daß unter den Sulfatmangelbedingungen die Möglichkeiten zum Ammoniumeinbau limitiert sind. Einerseits fehlen unter diesen Bedingungen Schwefelverbindungen zur Aufrechterhaltung des normalen C:N:S-Verhältnisses; andererseits wirkt die Schwefelversorgung durch die Thio-redoxin-Regulation verschiedener Enzyme aus dem Calvin-Zyklus direkt auf die CO_2 -Assimilation ein (23), so daß Schwefelmangel auch einen Mangel an Kohlenstoffskeletten bewirken könnte. Wenn limitierte Einbaumöglichkeiten die Ursache der Nitritanhäufung wären, sollte man aber vorher - und nicht erst viel später - Ammoniumausscheidung finden. Da

Nitrit früher als Ammonium ins Medium abgegeben wird, bleiben 2 Erklärungsmöglichkeiten:

1. Die Nitritausscheidung könnte Folge einer gezielten Regulation sein, die die Nitratassimilation bei S-Mangel auf der Stufe des Nitrits unterbricht.

Eine Regulation des Nitratstoffwechsels gerade auf der Stufe des Nitrits erscheint wenig sinnvoll: Zwar stehen die für Nitrataufnahme und -reduktion nötige Energie und Reduktionskraft den Dauerlicht-Kulturen in großem Ausmaß zur Verfügung (s.u.), aber gleichzeitig würden die Zellen das relativ inerte Nitrat in das toxische, nicht weiter verwendete Nitrit umwandeln, während im Bereich des Kohlenstoffwechsels unschädliche Möglichkeiten der Energieverwertung bestehen.

2. Der S-Mangel könnte eine "Unfähigkeit" der Zelle zur Nitritreduktion bewirken.

Die Untersuchung der Enzym Spiegel in Kulturen mit unterschiedlich starkem Sulfatmangel gibt einen möglichen Anhaltspunkt für solch eine gestörte Weiterreduktion des Nitrits: Früher als die anderen gemessenen Enzyme der Nitratassimilation (Nitratreduktase, Glutaminsynthetase) sinkt die Nitritreduktase-Aktivität (Abbildung 14). Bereits bei der Hälfte der üblichen Sulfatausgangskonzentration beträgt die Nitritreduktase-Aktivität nur noch etwa 60% der Kontrolle, während die Aktivität der anderen beiden Enzyme nahezu unverändert ist. Bei Beobachtung des Verlaufs über mehrere Tage findet man das drastische Absinken der Aktivität etwa gleichzeitig mit der ersten Nitritausscheidung (vgl. Abbildung 15 und 11).

Die Empfindlichkeit der Nitritreduktase gegenüber limitierter Schwefelversorgung läßt sich aus der Zusammensetzung des Moleküls leicht erklären: Bei Spinat enthält das Enzym neben einem Sirohäm auch ein Eisen-Schwefel-Zentrum (72); für Grünalgen ist von einem grundsätzlich gleichen Aufbau auszugehen (144), zusätzlich ist für *Chlorella* ein hoher Cysteingehalt des Enzyms beschrieben (182). Wenn erst Enzymneusynthese erfolgen muß, ist auch verständlich, daß nach Zugabe einer Schwefelquelle zu S-Mangel-Kulturen eine gewisse lag-Phase (etwa 2 Stunden) bis zur Nitritaufnahme vergeht (Abbildung 12).

Daß so verschiedene Schwefelquellen wie Sulfat, L-Cystein und

die L-Cystein-O-Alkylester - also oxidierte und reduzierte, natürlich vorkommende und künstliche Schwefelverbindungen - in gleichem zeitlichem Rahmen Nitritaufnahme bewirken (3.1.5.2), deutet zusätzlich darauf hin, daß diese Verbindungen tatsächlich nur als Schwefelquelle wirken und nicht etwa eine von ihnen ein Regulatormolekül oder dessen direkten Vorläufer darstellt. Eindeutig ausgeschlossen werden kann, daß die Wirkung von Schwefel auf der oxidierten Stufe ausgeübt wird (etwa über Sulfatester). In diesem Fall würde man deutlich raschere Nitritaufnahme nach Sulfat- als nach Cysteinzugabe erwarten, da die Oxidation von Cystein in *Chlorella* nur langsam erfolgt (16). Ob eine Schwefelverbindung zur Nitritaufnahme führt bzw. Nitritausscheidung verhindert, scheint nur davon abzuhängen, ob sie von den Algen aufgenommen und als Schwefelquelle genutzt werden kann. Das zeigt sich besonders deutlich nach Zugabe von L-Cystein (Abbildung 12b): Solange es reduziert vorliegt, bewirkt es Nitritaufnahme; nach Oxidation zum nicht nutzbaren Cystin wird langfristig wieder Nitrit ausgeschieden, bis erneut reduziertes Cystein zugegeben wird.

Die Tatsache, daß in Gegenwart von D-Cystein und L-Cystin unvermindert Nitrit ausgeschieden wird, steht dabei im Widerspruch zu früheren Beobachtungen (95), nach denen diese Aminosäuren (eingesetzt als einzige S-Quelle) Wachstum ermöglichen, das dem in Sulfat- oder L-Cystein-Kulturen vergleichbar ist. Auch die Wachstumsgeschwindigkeit entsprach in den hier gemachten Versuchen nicht der in Kontrollkulturen (nicht dargestellt).

Damit *Chlorella* L-Methionin als Schwefelquelle verwerten kann, müssen möglicherweise erst bestimmte Aufnahme- oder Abbaumechanismen induziert oder aktiviert werden, da nach Methionin-Zugabe deutlich längere Zeit bis zur Nitritaufnahme verstreicht als bei anderen S-Quellen.

Die in Batch-Kulturen von *Chlorella fusca* unter Sulfatmangel (bei Begasung mit erhöhtem CO₂-Partialdruck) erstmals gezeigte Nitritausscheidung beruht nach den hier dargestellten Ergebnissen anscheinend auf einer durch den Mangel bedingten verringerten Nitritreduktase-Aktivität. Nach Zugabe von ausreichend schnell verwertbaren S-Quellen und einer 1.5 bis 2.5stündigen

lag-Phase, in der wahrscheinlich Enzymsynthese stattfinden muß, kann das vorher ausgeschiedene Nitrit wieder aufgenommen werden.

4.2 Nitritstoffwechsel bei *Chlorella* unter Kohlenstoffmangel

Während sich die von *Chlorella fusca* unter Schwefelmangel ausgeschiedenen Nitritkonzentrationen im mikromolaren Bereich bewegen, wurde in Kulturen, die durch Luftbegasung ohne CO₂-Zusatz Kohlenstoffmangel aufwiesen, am 5. Tag nach dem Animpfen bis zu 6 mM Nitrit nachgewiesen. Das bedeutet, daß die Algen mehr als die Hälfte des Gesamtangebots an Nitrat (9.5 mM) zu Nitrit umgesetzt haben - zusätzlich zu dem, was sie im Rahmen ungestörter Nitratassimilation reduziert und in zelleigene Substanzen eingebaut haben. Ein anderer Ursprung des nachgewiesenen Nitrits kann ausgeschlossen werden (Ergebnisse nicht dargestellt): Weder scheiden Ammonium-ernährte Kulturen von *Chlorella fusca* unter diesen Bedingungen Nitrit aus, noch erfolgt eine photochemische - möglicherweise durch Ausscheidungsprodukte katalysierte - Nitratreduktion. (Nach Abzentrifugieren oder Abkochen der Algen wird kein weiteres Nitrit im Medium gebildet.)

Trotz der hohen Nitritausscheidung, die man wohl als Indiz für einen erheblich beeinträchtigten Stoffwechsel ansehen darf, wachsen die *Chlorella* - Kulturen auch bei Begasung nur mit Luft noch: Chlorophyllgehalt und Zellzahl - als einfach bestimmbare Parameter des Wachstums - nehmen weiter zu. Außerdem ist bei Erhöhung des CO₂-Angebots eine fast sofortige Umsteuerung des Stoffwechsels, sichtbar als einsetzende Nitritaufnahme, möglich. Den für das - gegenüber hohem CO₂-Angebot allerdings stark verlangsamte (vgl. Abbildung 1 a und b) - Wachstum notwendigen Anteil an Nitrat können die Algen anscheinend noch vollständig reduzieren (98). Soweit Durchreduktion erfolgt, wird das entstandene Ammonium quantitativ eingebaut, denn Ammonium läßt sich erst in sehr späten Wachstumsstadien und in geringen Konzentrationen (mindestens Faktor 100 unter den gleichzeitig gemessenen Nitritkonzentrationen) als Ausscheidungsprodukt nachweisen. Daß bei einer Ammoniumproduktion über die Ein-

baumöglichkeiten hinaus auch dieses ins Medium abgegeben wird, zeigen die Versuche mit CO₂-freier Begasung (Abbildung 2b).

Voraussetzung dafür, daß die Algen trotz der hohen Nitritkonzentrationen wachsen können, ist der gleichzeitig beobachtete starke pH-Anstieg (42,171; Abbildung 1a) andernfalls könnte das Nitrit als undissoziierte salpetrige Säure in die Zellen diffundieren (81,86) und dort toxisch wirken (s.u.).

Die Alkalisierung des Mediums ist wie die Nitritausscheidung durch die Algen ein Zeichen des CO₂-Mangels: Bei ausreichender CO₂-Konzentration wird das Medium durch das System Kohlensäure/Hydrogencarbonat im Neutralbereich gepuffert. (Für die scheinbare Dissoziationskonstante der Kohlensäure gilt $pK_s = 6.35$.) Fehlt die dafür nötige CO₂-Konzentration durch vermehrten CO₂-Verbrauch der dichteren Kulturen, so macht sich das mit der Anionenaufnahme durch die Algen verbundene Protonendefizit (aus Protonen-Kotransport oder Austausch gegen Hydroxylionen) bemerkbar. Da CO₂-Mangel, pH-Anstieg und Nitritanhäufung also im Normalfall gleichzeitig auftreten, mußte durch zusätzliche Experimente geklärt werden, ob nicht der pH-Anstieg die eigentliche Ursache der Nitritausscheidung ist. Dazu wurde mit MOPSO/KOH ein biologisch verträgliches Puffersystem (47,59) gewählt, mit dem auch bei Kohlendioxid-Mangel etwa ein pH-Wert von 7 gehalten werden konnte. Die Einsetzbarkeit der Sulfonatpuffer wurde für verschiedene Organismen, u.a. auch für Grün- und Blaualgen untersucht (47). Für die hier beschriebenen Versuche läßt sich darüber hinaus ein Eingreifen der Puffersubstanz in den Stoffwechsel der Algen ausschließen, da Sulfonsäuren von *Chlorella fusca* bei ausreichender Sulfatversorgung nicht aufgenommen und metabolisiert werden (17). Gepufferte *Chlorella*-Kulturen scheiden ebenfalls Nitrit aus und zwar in Konzentrationen, die denen der ungepufferten Kontrollen vergleichbar sind (Abbildung 4); die Nitritausscheidung ist also direkt eine Folge des CO₂-Mangels. Daß die Nitritexkretion in gepufferten Kulturen gegenüber den Kontrollen verzögert auftritt, zeigt wie komplex die Wechselwirkung zwischen CO₂-Konzentration und pH-Wert ist: Einerseits trägt CO₂ zur Pufferung des Mediums bei; andererseits ist die Kohlenstoffversorgung der Algen - bei gleicher CO₂-Zufuhr von außen - bei neutralem pH besser als im

Alkalischen, da sie Kohlendioxid und nicht Hydrogencarbonat aufnehmen (3,170).

Das entgegengesetzte Experiment - Pufferung des Mediums im Alkalischen und Zufuhr von Luft + 5% CO₂ - ist nicht durchführbar, da die Pufferkapazität des Kohlensäure/Hydrogencarbonat-Systems stärker ist als die der im alkalischen Bereich untersuchten biologischen Puffer (POPSO, TAPSO, TAPS) in physiologisch vertretbaren Konzentrationen. Um die Gleichgewichtskonzentration an CO₂ zu erhöhen, ohne den pH-Wert zu beeinflussen, wurde deshalb Hydrogencarbonat oder ein Gemisch aus Hydrogencarbonat und Carbonat zugegeben (Abbildung 7). Obgleich der pH-Wert des Mediums dadurch leicht steigt, wird kein weiteres Nitrit ausgeschieden; gleichzeitig beobachtet man eine Wachstumsbeschleunigung (nicht dargestellt). Damit wurde auf zweierlei Weise gezeigt, daß CO₂-Mangel - unabhängig vom pH-Wert - die Ursache für Nitritausscheidung durch *Chlorella fusca* ist. Während Kohlenstoff-Zugabe in Form von (Hydrogen-)Carbonat nur die weitere Nitritausscheidung verhindert, setzt bei Kohlenstoff-Zufuhr durch Erhöhung des CO₂-Partialdrucks auf 5% innerhalb kurzer Zeit (15 bis 30 Minuten) sogar Nitritaufnahme ein. Für die Nitritaufnahme ist demnach entweder ein schnelleres Wachstum oder direkt eine höhere CO₂-Konzentration erforderlich, als sie durch Hydrogencarbonatzugabe erreicht werden kann. Solange noch Nitrit im Medium vorhanden ist, wird nur dieses aufgenommen; die Nitritaufnahme bleibt unterbrochen (Abbildung 6). Das erscheint aus energetischer Sicht sinnvoll, setzt aber gleichzeitig voraus, daß auch die Nitritaufnahme gezielt erfolgt und direkt - oder indirekt durch das bei der Reduktion daraus gebildete Ammonium - die Nitritaufnahme reguliert.

Diese Überlegung war Anlaß dafür, nicht nur die Netto-Aufnahmeraten der 3 stickstoffhaltigen anorganischen Ionen (Nitrat, Nitrit, Ammonium) sondern auch ihre gegenseitige Beeinflussung bei unterschiedlicher Begasung (Luft, erhöhtes CO₂ und Übergang von Luft auf erhöhtes CO₂) zu untersuchen (Tabelle 1 und 2). Für den eben diskutierten Fall, daß nebeneinander Nitrat und Nitrit im Medium vorliegen, ergeben sich abhängig von der Kohlendioxid-Versorgung ganz unterschiedliche Verhältnisse: Unter Luft-

begasung wird - wie bei Nitritausscheidung zu erwarten, gemessen wurden Nettoraten - nur Nitrat aufgenommen, bei Begasung mit Luft + 5% CO₂ werden Nitrat und Nitrit nebeneinander aufgenommen; nur bei Erhöhung des CO₂-Partialdrucks von 0.035% auf 5% kommt es zur bevorzugten Aufnahme von Nitrit gegenüber Nitrat. Da unter diesen Bedingungen sicher eine stark beschleunigte CO₂-Assimilation stattfindet (anders als bei Dauerbegasung mit hohem CO₂-Gehalt), ist der sparsame Umgang mit Reduktionsenergie bei der Stickstoffassimilation für die Zellen vorteilhaft: Wie die Nitrataufnahme, die bei langfristiger Begasung mit 5% CO₂ neben der Nitritaufnahme erfolgt, gehemmt wird, ist unklar. Liegt Nitrit als einziges Stickstoffion vor, so kann es auch bei Luftbegasung aufgenommen werden (Tabelle 1), wenn auch mit deutlich niedrigeren Raten als bei hohem CO₂-Angebot.

Ein entsprechendes Phänomen zeigt sich - wenn auch weniger deutlich ausgeprägt - bei gleichzeitigem Angebot von Nitrit und Ammonium: Bei Dauerbegasung mit 5% CO₂ werden beide Ionen nebeneinander aufgenommen, bei vorausgegangener Luftbegasung und Erhöhung des CO₂-Partialdrucks gleichzeitig mit Umwaschen ins Nitrit-/Ammoniummedium wird das vollständig reduzierte Ammonium bevorzugt gegenüber Nitrit aufgenommen. Dieser Befund weist eindeutig darauf hin, daß auch die Nitritaufnahme von den Algen in Abhängigkeit von der Ammoniumverfügbarkeit kontrolliert werden kann, und schließt ungehinderten Transport allein über Diffusion aus.

Gleichzeitig unterstützen die Versuche eine Erklärungsmöglichkeit für die unterschiedliche Wirkung von Ammoniumchlorid-Zusatz auf die Nitritausscheidung: Während bei hoher CO₂-Verfügbarkeit Ammonium die Nitrataufnahme hemmt, wird bei CO₂-Mangel erheblich mehr Nitrat als Ammonium aufgenommen. Offensichtlich kann unter den letztgenannten Bedingungen der Ammonium-Metabolit, der die Nitrataufnahme hemmen soll (61,100,106), nicht mehr gebildet werden. Eine wenig wahrscheinliche, andere Erklärungsmöglichkeit wäre die, daß die in diesem Stadium aufgenommene Ammoniummenge (vgl. Tabelle 2) nicht zur Hemmung der Nitrataufnahme ausreicht. Damit lassen sich die Befunde aus 3.1.1.5 folgendermaßen interpretieren: Bei frühzeitiger Ammoniumchlorid-Zugabe (z.B. beim Animpfen) wird die regulierende

Ammoniumverbindung in ausreichendem Maß gebildet, um die Nitrataufnahme längerfristig zu hemmen. Allmählich wird die Verfügbarkeit des für den Ammonium-Einbau benötigten Kohlenstoff-Skeletts so gering, daß ungehinderte Nitrataufnahme und Ausscheidung nach Reduktion zu Nitrit erfolgen kann (99). In einem bestimmten Stadium kann das - leicht verwertbare - Ammonium anscheinend den Stoffwechsel so sehr beschleunigen, daß die Ausweitung des Kohlenstoffmangels - und damit die Nitritausscheidung - sogar verstärkt wird (vgl. 3.1.1.5).

Bei Zugabe von Nitrit zu Kulturen, die vorher mit hoher CO_2 -Konzentration gezogen wurden und die deshalb nitritfrei waren, beobachtet man eine kurzfristige Ausscheidung von Ammonium bis höchstens $50 \mu\text{M}$ innerhalb der ersten Stunde nach Nitritzugabe (Abbildung 10). Sie deutet darauf hin, daß die Nitritreduktion bzw. -aufnahme unter diesen Bedingungen über den Bedarf an einbaubarem Ammonium hinaus möglich ist und tatsächlich vorher über die Bereitstellung von Nitrit aus der Nitratreduktion reguliert wird. Daß die Ammoniumanhäufung nur kurzfristig sichtbar ist, zeigt wiederum, daß auch die Nitritaufnahme bei *Chlorella* über das Angebot an Ammonium reguliert wird (siehe oben). Entsprechendes ist auch für die Grünalge *Chlamydomonas* beschrieben (31).

Die Tatsache, daß Zuckerzugabe bei luftgezogenen Algen keine Veränderung der Nitritausscheidung bewirkt, wohl aber bei Verdunklung oder völligem CO_2 -Entzug (vgl. 3.1.2.3), deutet darauf hin, daß die Zucker für *Chlorella fusca* bei Luftbegasung nicht in ausreichendem Maß nutzbar sind. Das Hexosetransport-System ist bei dieser Alge zwar teilweise konstitutiv (64), wird unter induzierenden Bedingungen - d.h. dunkel/aerob oder im Licht/anaerob (161) - aber um mehr als das Dreifache erhöht.

Die Nitrataassimilation findet bei Algen nur im Licht statt (106,162). Einige der Enzyme (Nitritreduktase, Glutamatsynthase) sind durch ihre Ferredoxin-Abhängigkeit direkt an den photosynthetischen Elektronentransport gekoppelt (118,144,182), auch das NADH/H^+ für die Nitratreduktion stammt indirekt aus der Photosynthese (100). Für die Glutaminsynthetase wurde eine Lichtregulation über Thioferedoxine gezeigt (168). Auch die Aktivitäten von Nitratreduktase und Nitritreduktase sind im Licht

20 bis 30fach höher als im Dunkeln, wobei das Regulationsprinzip noch ungeklärt ist (142,149,162). Deshalb wurde die Lichtabhängigkeit der Nitritausscheidung durch *Chlorella* untersucht.

In der Regel wuchsen die Kulturen bei einer Lichtintensität von etwa 15 000 Lux im Dauerlicht; bei Verdunklung fand keine Nitritausscheidung statt. Im Rahmen der untersuchbaren Beleuchtungsstärken ergab sich eine Lichtsättigung bei etwa 8 000 Lux, wobei der genaue Wert von der Kulturdichte - und damit der gegenseitigen Beschattung der Algen - abhing. Schon bei der Hälfte der normalerweise verwendeten Lichtmenge findet man also - abgesehen von geringfügigen Verzögerungen im Anfangsstadium - keine Abhängigkeit der Nitritexkretion von der Lichtintensität mehr.

Azuara und Aparicio (6,7,8) sehen in der Nitritausscheidung eine "Nitratrespiration", eine Vernichtung überschüssiger Redoxenergie zum Schutz vor Photoinhibitionsprozessen. Die Annahme ist naheliegend, daß *Chlorella* durch die Dauerbelichtung ein Überangebot an Redoxenergie erhält, wenn durch den allmählichen Kohlendioxidmangel kein rasches Wachstum mehr möglich ist. Durch die Nitratreduktion können sowohl überschüssige Reduktionsäquivalente, die über den Malat/Oxalacetat-Shuttle ins Cytoplasma gelangen, als auch Energie in Form von ATP (für die Nitrataufnahme) vernichtet werden.

Auf der Basis dieser Überlegungen müßte man für *Chlorella fusca* bei Luftbegasung eine Lichtsättigung zwischen 6 000 und 8 000 Lux annehmen, denn bei 5 800 Lux wirkt das Licht trotz Kohlenstoffmangel noch als wachstumslimitierender Faktor (Abbildung 3c). Wenn darüber hinaus Lichtenergie zugeführt wird, kommt es zur "dissimilatorischen" Nitratreduktion und damit zur Nitritausscheidung. Darin liegt möglicherweise der Grund dafür, daß die Nitrataufnahme durch CO₂-Limitierung verhältnismäßig wenig verringert wird, die Aufnahme des vollständig reduzierten Ammoniums am stärksten (98; Tabelle 1).

Zur Verwertung von Reduktionsäquivalenten wäre allerdings eine Weiterreduktion von Nitrit zu Ammonium wirkungsvoller, da hierfür immerhin 6 Elektronen benötigt werden, im Vergleich zu den 2 für die Reduktion von Nitrat zu Nitrit. Die Weiterreduktion sollte grundsätzlich möglich sein, wenn das katalysierende

Enzym, die Nitritreduktase, wie allgemein angenommen (21,61,85, 106,134) immer in großem Überschuß gegenüber der Nitratreduktase vorliegt. Eine Bildung von Ammonium statt Nitrit hätte zudem den Vorteil, daß es weniger toxisch wirkt.

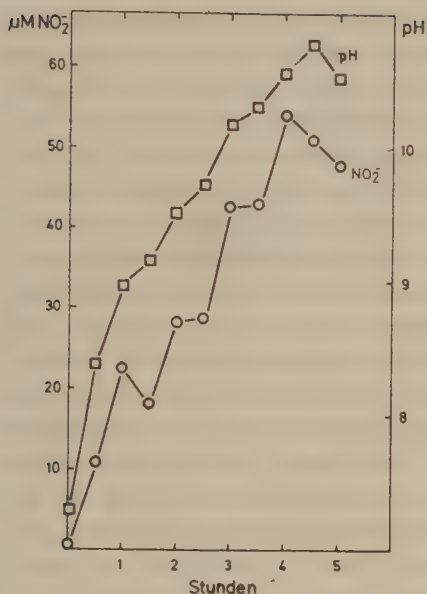
Aus den oben genannten Überlegungen heraus kann man vermuten, daß unter den Bedingungen des CO_2 -Mangels die Durchreduktion des Nitrats, d.h. die Weiterreduktion von Nitrit zu Ammonium, nicht in großem Umfang möglich ist. Deshalb wurden die Aktivitäten von Enzymen des Nitrastoffwechsels (Nitratreduktase, Nitritreduktase, Glutaminsynthetase) unter Bedingungen vollständiger Assimilation einerseits (d.h. Begasung mit Luft + 5% CO_2) mit denen unter Nitritausscheidungsbedingungen andererseits (Luftbegasung) verglichen (Tabelle 5). Dabei ergibt sich - weit über das auch bei den anderen beiden Enzymen gemessene Absinken hinaus - eine drastisch niedrigere Aktivität der Nitritreduktase bei Luftbegasung. Sie liegt unter diesen Bedingungen unter der Nitratreduktase-Aktivität, was den Umstand der Nitritausscheidung leicht erklären könnte. Dieser Befund widerspricht - soweit man das aus in-vitro-Bestimmungen schließen darf - der oben zitierten Annahme, die Nitritreduktase sei immer im Überschuß vorhanden. Daß unter CO_2 -Mangel keineswegs alle Enzymaktivitäten verringert sind, zeigt die gleichzeitig gemessene Thiosulfatreduktase (Tabelle 5), deren Aktivität bei Luftbegasung sogar leicht erhöht ist. Hierin spiegelt sich möglicherweise die Tatsache, daß die TSR bei *Chlorella* nicht über den Sulfat- sondern den Cysteinpool der Zellen reguliert wird (16) und damit auch von der Kohlenstoffverfügbarkeit abhängig sein sollte.

Bei Veränderung des CO_2 -Partialdrucks reagieren *Chlorella* - Kulturen darauf innerhalb einer halben Stunde mit Nitritausscheidung bzw. -aufnahme; währenddessen muß also eine entscheidende Umsteuerung des Stoffwechsels erfolgen. Untersucht man die Enzymspiegel in diesem Zeitraum, so beobachtet man aber eine wesentlich langsamere Reaktion auf Veränderungen des CO_2 -Angebots. Zwar mißt man 60 Minuten nach Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks auf 5% erstmals eine Steigerung und nach 90 Minuten eine Verdopplung der Nitritreduktase-Aktivität, aber diese Entwicklung ist noch nach 5 Stunden nicht abgeschlossen; zudem

wird sie zunächst von einer Erhöhung der Nitratreduktase-Aktivität teilweise kompensiert (Abbildung 13c). Noch weniger können die Meßergebnisse bei Verringerung des CO_2 -Angebots die einsetzende Nitritausscheidung erklären: Übereinstimmend bei allen gemessenen Enzymen beobachtet man einen Aktivitätsanstieg während der ersten Stunden nach CO_2 -Entzug (Abbildung 13a). Dabei verschiebt sich zwar das Nitratreduktase : Nitritreduktase-Verhältnis zuungunsten der Nitritreduktase (Abbildung 13b), jedoch noch nach 5 Stunden liegt die Aktivität der Nitritreduktase über derjenigen der Nitratreduktase (beim Übergang von erhöhtem CO_2 auf Luft sogar um mehr als Faktor 5). Erst nach 24 Stunden mißt man Nitritreduktase-Aktivitäten, die unter den jeweils entsprechenden Nitratreduktase-Aktivitäten liegen. Dieser Verlauf macht wahrscheinlich, daß neben den Enzymaktivitäten ein weiterer Faktor existiert, der die Rate der Nitritreduktion reguliert. Dabei müssen 2 Tatsachen bei der Interpretation der eben beschriebenen Ergebnisse berücksichtigt werden:

1. Die Enzymaktivitäten wurden in in-vitro-Ansätzen bestimmt, da die in-vivo-Messungen etwa für die Nitratreduktase nicht eindeutig interpretierbar sind (94,124) und speziell für die Nitritreduktase keine sinnvolle Möglichkeit zur in-vivo-Bestimmung besteht (s.u.).
2. Zu jedem Zeitpunkt der Meßreihen mußte eine eigene Kultur geerntet werden, um eine ausreichende Menge an Algenmaterial zu erhalten. Entwicklungen der Enzymaktivitäten als Folge der veränderten Begasung werden also überlagert von statistischen Unterschieden zwischen den einzelnen Kulturen. Der Verlauf von Nitritgehalt und pH-Wert bei Wechsel von Begasung mit Luft + 5% CO_2 zu CO_2 -freier Luft (Abbildung 31) zeigt jedoch exemplarisch, daß man wohl grundsätzlich von einer einheitlichen Entwicklung ausgehen kann.

Die in der Literatur diskutierten Ursachen für Nitritausscheidung bei Algen unter Kohlenstoffmangel können die hier dargestellten Ergebnisse alle nur schlecht erklären. Azuara und Aparicio beobachteten eine Blaulichtaktivierung der Nitratreduktase (6,7); diese sollte jedoch zunächst unabhängig vom CO_2 -Gehalt der zugeführten Luft sein. Eine indirekte Wirkung über Veränderungen im Pigmentgehalt der Algen und damit der Lichtab-



Abbildungung 31

Nitritgehalt und pH-Wert verschiedener Kulturen nach CO₂-Entzug

Dargestellt sind während 5 Stunden nach Übergang von Begasung mit Luft + 5% CO₂ zu CO₂-freier Luft jeweils die Meßwerte für die geerntete Kultur (vgl. Text und Abb. 13a)

sorption ist denkbar; sie müßte sich aber in den gemessenen Enzymaktivitäten niederschlagen. Die Meßergebnisse unterstützen diese Erklärung nicht - es sei denn, die Aktivierung wäre in der in-vitro-Messung nicht sichtbar. Die für die Nitratreduktase auf CO₂-Entzug hin beobachtete Aktivitätssteigerung (Abbildung 13b) ist unspezifisch, findet sich zunächst bei allen gemessenen Enzymen und wurde auch für die gesamte Photosyntheseaktivität beschrieben (181).

Eine weitere Hypothese (97) schlägt vor, daß ein Rückstau von mangels Kohlenstoffskeletten nicht einbaubarem Ammonium die Nitritausscheidung bewirkt; Hinweise auf eine Endprodukthemmung der Nitritreduktase liegen vor (12). Wäre sie Ursache der Nitritausscheidung, dann würde man vor der Nitritexkretion Ammonium im Medium erwarten, wie es auch bei manchen Algen gefunden wurde (7,100,110), nicht aber in den hier durchgeführten Versuchen mit *Chlorella fusca*. Darüber hinaus sollte - sobald überhaupt Nitritausscheidung eingesetzt hat, der Kohlenstoffmangel also mit Sicherheit vorliegt - Ammoniumzugabe von außen

immer zu einer Beschleunigung, niemals aber zu einer Hemmung der Nitritexkretion führen (vgl. Abbildung 5).

Eine denkbare Erklärungsmöglichkeit für die Diskrepanz zwischen dem Verlauf der Nitritausscheidung und der Enzymaktivität wäre die, daß die mit Methylviologen als künstlichem Elektroendonator gemessene Nitritreduktase-Aktivität nicht der tatsächlich in der Zelle zur Verfügung stehenden Enzymkapazität entspricht. Wie zunächst für das Enzym aus Spinat (72) und kürzlich auch für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (144) gezeigt wurde, besitzt die native Nitritreduktase zusätzlich zur eigentlich katalytischen eine kleinere Untereinheit (25 000 D), die für die Ferredoxin-Nutzung notwendig ist. Falls Menge oder Anbindung dieser Untereinheit von der CO₂-Verfügbarkeit beeinflusst wären, könnte das die Nitritexkretion trotz hohem Spiegel der Methylviologen-abhängigen Aktivität erklären. Zusätzlich müßte man dann einen sekundären Abbau auch der katalytischen Untereinheit bei mangelnder Funktionsfähigkeit fordern, um den späteren Rückgang der mit Methylviologen gemessenen Aktivität zu erklären (Abbildung 13a). Diese Möglichkeit läßt sich experimentell schlecht überprüfen, da im zellfreien System immer auch ein Anteil an unvollständigem Enzym vorliegt (144). Der alternative Ansatz - eine "in-vivo"-Messung der Enzymaktivität an intakten Chloroplasten - ist bei *Chlorella* nicht möglich, da keine intakten Chloroplasten isoliert werden können. Außerdem ließen sich in einem solchen Versuch die eigentliche Nitritreduktion und der Nitrittransport in den Chloroplasten nicht voneinander trennen (s. unten).

Damit ist bereits der Ansatzpunkt erwähnt, der in dieser Arbeit als mögliche Erklärung für die Nitritausscheidung untersucht wurde: Auf Grund der Kompartimentierung in der pflanzlichen Zelle - Nitratreduktase im Cytoplasma, Nitritreduktase im Chloroplasten - muß das Nitrit vor seiner Weiterreduktion durch den Chloroplasten-Envelope gelangen. Die äußere Hüllmembran ist durch das unspezifische Porin für Moleküle bis zu einer Größe von 10 000 D permeabel (67,68,69); die innere Membran stellt die eigentliche metabolische Schranke dar (68), die allerdings in diesem Fall durch Diffusion von HNO₂ überwunden werden kann (81). Daß die Verteilung einer in großem Maß benö-

tigten und zudem toxischen Substanz - Nitrit beeinträchtigt den photosynthetischen Elektronentransport (154,157) und als Salz einer schwachen Säure ($pK_s=3.4$) den Aufbau des Protonengradienten (13,44,71,81) - von den Zellen nicht kontrolliert wird, ist unwahrscheinlich. Die Untersuchung dieses Problems bereitet jedoch aus mehrerlei Gründen experimentelle Schwierigkeiten:

1. Aus *Chlorella* lassen sich keine Chloroplasten zur Messung von Nitrittransport isolieren, da die groben Aufschlußmethoden, die notwendig sind um die Zellwand aufzubrechen, gleichzeitig die Organellen zerstören.
2. Messungen an ganzen Zellen scheiden aus, da dann als zusätzliche Barriere das Plasmalemma überwunden werden muß, das eine deutlich geringere Permeabilität für Nitrit besitzt als der Envelope (81). Wie der Nitrittransport über das Plasmalemma erfolgen kann und damit auch der hier beschriebene Nitritefflux, ist umstritten. Es gibt sowohl Hinweise auf ein eigenes Nitritaufnahme-system (30,31) als auch darauf, daß der Transport über den Nitratcarrier erfolgt (32,160).
3. Es existiert kein ausreichend langlebiges N-Isotop für radioaktive Routinemessungen. Die photometrische Nitritbestimmung über die Diazotierungsreaktion ist zwar recht empfindlich, wird aber z.B. durch Reduktionsmittel wie $NADH_2$ gestört (131), so daß sie in physiologischen Systemen nicht zuverlässig ist.
4. Die meist verwendete Methode zur Bestimmung des Nitrittransports - die Messung des bei der Reduktion freiwerdenden Sauerstoffs - kann nicht zwischen Limitierung durch Transport und Reduktase unterscheiden. Das spielt bei optimaler Nährstoffversorgung wahrscheinlich keine Rolle, weil die Nitritreduktase dann in ausreichendem Überschuß vorhanden ist, um alles Nitrit im Chloroplasten sofort zu reduzieren. Das gilt jedoch nicht mehr unter den hier untersuchten Mangelbedingungen (s. 3.2.1.1 und 3.2.2.1). Daneben ergeben sich zusätzliche Schwierigkeiten für die Trennung der Nitritreduktion vom Kohlenstoffwechsel: Einerseits darf im Versuchsansatz kein CO_2 zur Verfügung stehen, damit die O_2 -Produktion eindeutig auf Nitritreduktion zurückgeführt

werden kann, andererseits kann Kohlenstoffmangel schnell auf den Nitritstoffwechsel zurückwirken (entweder über die hier beschriebenen Prozesse, die zur Nitritausscheidung führen, oder über Ammoniumhemmung der Nitritreduktase bei Mangel an Kohlenstoffskeletten).

Deshalb wurde in dieser Arbeit eine an *Chlorella* - Membranen beobachtete Reaktion als Hilfsmittel verwendet, die auf den ersten Blick nicht in Zusammenhang mit dem geforderten Nitrittransport steht: Eine Fraktion aus Membranpräparationen - sie wurde an *Chlorella sorokiniana* als Chloroplasten-Envelope charakterisiert (s. 3.3.1.5) - katalysiert in Gegenwart von Dithionit, Cystein und FMN die Reduktion von Nitrit zu Ammonium und Stickstoffmonoxid. Der zunächst naheliegende Gedanke, es handle sich dabei um einen membrangebundenen Anteil der Nitritreduktase, kann ausgeschlossen werden, wenn man die Eigenschaften der beiden Reduktionsreaktionen vergleicht (Tabelle 6 und 14): Die unterschiedliche Spezifität für Elektronendonatoren - nur Methylviologen im Fall der Nitritreduktase, FMN besser als Methylviologen bei der Membrankatalyse - und auch die unterschiedlichen pH-Optima (pH 7.5 für die Nitritreduktase (182) bzw. 7.0 an der Membran) ließen sich vielleicht aus einer Konformationsänderung erklären, die durch die Membranbindung bedingt sein könnte. Auch daß Membranassoziation grundsätzlich eine veränderte Hemmstoffempfindlichkeit bewirkt, ist vorstellbar, nicht jedoch wechselseitig im einen Fall größere Empfindlichkeit der Nitritreduktase (Cyanid) und im anderen Fall (EDTA) der Membranreaktion (vgl. Tabelle 14). Diese Tatsache zeigt eindeutig, daß es sich um 2 vollständig verschiedene Reaktionen handeln muß und ermöglicht andererseits ihre experimentelle Trennung: Die Nitritreduktase ist aus der Messung der Membranreaktion bereits durch Verwendung von FMN als Elektromendonator ausgegrenzt; ein Ausschluß der Membranreaktion bei der Nitritreduktase-Bestimmung (der hier verwendete Rohextrakt enthielt immer noch Membranbruchstücke) wurde durch Zugabe von 50 μ M EDTA erreicht. Gleichzeitig wird damit auch die gelegentlich die Enzymmessungen überlagernde, chemische Nitritreduktion (65, 80) verhindert.

Tabelle 14 Vergleich von Nitritreduktase und membrankatalysierter Nitritreduktion

Hemmstoff	% der Kontrollaktivität	
	Membran	Nitritreduktase
50 μ M EDTA	0	100
10 mM Citrat	2	100
20 mM Pyrophosphat	1	106
40 μ M KCN	42	0
1 mM o-Phenanthrolin	3	93

Die Werte für die Membrankatalyse stammen aus Tabelle 7. Die Nitritreduktase-Aktivität wurde nach 2.4.2.2 bestimmt. Die Ansätze enthielten Rohextrakt mit 60.4 μ g Protein. Die Kontrollaktivität betrug 99 μ mol/mg*h.

Da die membrankatalysierte Nitritreduktion noch bei der völlig unphysiologischen Nitritkonzentration von 12 mM keinerlei Sättigung zeigt, handelt es sich offensichtlich nicht um einen enzymatischen Vorgang. Zum Vergleich: Der K_M -Wert der Nitritreduktase aus *Chlamydomonas* liegt bei 380 μ M (144). Es wurden verschiedene artifizielle Systeme der Nitritreduktion beschrieben, die gewisse Gemeinsamkeiten mit der hier beobachteten Reaktion aufweisen. So wurde bei pH-Werten unter pH 7.5 Nitritreduktion durch Benzylviologen-Radikale gezeigt (70), bei der keine quantitative Bildung von Ammonium erfolgt (vgl. 3.3.1.1). Hewitt et al. berichten dabei jedoch bis pH 5.5 steigende Reduktionsraten mit sinkendem pH (im Gegensatz zum hier gefundenen deutlichen Optimum bei pH 7, Abbildung 17) und eine in der Membranreaktion nicht meßbare Steigerung durch Zusatz von Ammoniumsulfat. Giotta und Wang (58) haben metallkatalysierte, EDTA-hemmbar Reduktion verschiedener organischer Stickoxidradikale durch Thiole beschrieben. Dort wirken jedoch die Thiole selbst, die dabei zu Sulfonsäuren oxidiert werden, als Reduk-

tionsmittel (48), während in der hier untersuchten Reaktion die Nitritreduktion Dithionit-abhängig ist (Tabelle 6). Eine Photoreduktion durch FMN (114,177) unter den durch Dithionit gegebenen anaeroben Bedingungen kann dadurch ausgeschlossen werden, daß die Reaktion EDTA-hemmbar ist, während die Photoreduktion EDTA-abhängig ist (114). Schließlich wird Nitritreduktion auch als Seitenaktivität der teilweise membrangebundenen Sulfitreduktase beobachtet (4); diese ist jedoch im Gegensatz zur hier beschriebenen Reaktion (Ergebnisse nicht dargestellt) vollständig bereits durch niedrige Sulfidkonzentrationen hemmbar.

Insoweit als Stickstoffmonoxid (NO) Endprodukt der membrankatalysierten Nitritreduktion ist (Abbildung 16) bestehen Gemeinsamkeiten mit der dissimilatorischen Nitritreduktase verschiedener Prokaryonten. Für *Pseudomonas aureofaciens* wurde beschrieben (183), daß dieses Enzym durch 1 mM Cyanid oder o-Phenanthrolin vollständig hemmbar ist, kaum dagegen durch 1 mM Azid (vgl. Tabelle 7).

Da Nitritreduktion mit den gleichen Charakteristika wie denen der membrankatalysierten Reaktion auch bei Zugabe geringer Konzentrationen von Eisenionen erfolgt (3.3.2.2), drängt sich zunächst der Verdacht auf, daß es sich bei der Membranreaktion um eine unspezifische Reduktion durch membranassoziierte Metallionen handelt. Er wird noch dadurch unterstützt, daß für einige Fe-S-Proteine Nitritreduktion (zu NO) durch Ascorbat gezeigt wurde (27); Dithionit sollte dabei gegenüber Ascorbat als Reduktionsmittel gleichwertig sein. Die an reinem Ferredoxin, einem typischen pflanzlichen Eisen-Schwefel-Protein, gemessene Nitritreduktationsaktivität ist aber deutlich niedriger als selbst bei einer nicht bezüglich Envelope angereicherten Membranpräparation (Tabelle 8b). Zudem würde man in diesem Fall Nitritreduktion in mehreren Membranfraktionen erwarten, besonders an den Thylakoid- und Mitochondrieninnenmembranen, wo eine Vielzahl metallhaltiger Komponenten lokalisiert ist. Stattdessen findet man sie ausschließlich in der Envelopefraktion. Schließlich weist die Regulation der nitritreduzierenden Membrankomponente bezüglich Stickstoffversorgung - nämlich ein völliges Fehlen bei Wachstum mit reduziertem Stickstoff (3.4.3.2), wie es auch für Nitrat- und Nitritreduktase beobach-

tet wird (167) - eindeutig auf einen physiologischen Zusammenhang mit der Nitratreduktion. Die bisher verfügbaren Daten lassen sich am einfachsten so erklären, daß die Nitritreduktion an den *Chlorella* - Membranen eine artifizielle, durch einen spezifisch Nitrit bindenden Faktor der Envelopemembran ermöglichte Reaktion ist. Wahrscheinlich wird durch die Nitritbindung die Geschwindigkeit der Reduktion so weit gesteigert, daß dann selbst die Spuren an Eisen, die in allen Chemikalien vorliegen (63), zur Reduktion ausreichen. Eine solche durch sehr geringe Metallkonzentrationen hervorgerufene, nicht-enzymatische Elektronenübertragung wurde auch bei der Nitritreduktion mit Ferredoxin vermutet (80,123). Diese artifizielle Reduktion bietet aber eine einfache Möglichkeit, die offensichtlich am Nitritstoffwechsel beteiligte Envelopekomponente experimentell zu erfassen.

Eine am Nitritstoffwechsel beteiligte und am Chloroplasten-Envelope lokalisierte Membrankomponente hat wahrscheinlich eine Funktion bei der Nitritbereitstellung für die Weiterreduktion im Chloroplasten, d.h. zwischen der Nitritbildung durch die Nitratreduktase-Reaktion im Cytoplasma und dem Verbrauch durch die Nitritreduktase im Stroma. Denkbar wären dabei folgende Aufgaben:

1. eine Nitritpermease
2. eine Nitritbindungsstelle, um dessen freies Auftreten zu regulieren
3. eine Bindungsstelle für eines der beiden beteiligten Enzyme, die gleichzeitig Nitrit bindet.

Während die äußere Envelopemembran für Verbindungen von der Größe des Nitritions durchlässig ist (67,68), ist umstritten, wie das Nitrit durch die innere Membran gelangt. Einige Autoren (66) gehen ausschließlich von Diffusion (von NO_2^- bzw. HNO_2) aus, während in anderen Arbeiten ein von den Zellen kontrollierter Transport, also eine Nitritpermease oder ein Nitritcarrier gefordert wird (73,92,142,156,158). Nitrit stellt eine einerseits in großem Umfang benötigte und andererseits schon in relativ niedrigen Konzentrationen schädliche Stoffwechselverbindung dar. Bei einer solchen Substanz ist unwahrscheinlich, daß die Verfügbarkeit nur von der Gleichgewichtskonzentration

an salpetriger Säure (der Permeabilitätskoeffizient für salpetrige Säure am Envelope ist um den Faktor 10^5 höher als für das Nitritanion; 81) und der Diffusion abhängt. Transport ausschließlich durch Diffusion würde gleichzeitig bedeuten, daß - wenn nicht die Diffusion durch den Envelope ständig limitierender Schritt der ganzen Nitratassimilation sein soll, wofür es keine Hinweise gibt - die verhältnismäßig aufwendige Nitratreduktion (Energieverbrauch für die Nitrataufnahme, Export von Reduktionsäquivalenten aus dem Chloroplasten ins Cytoplasma und deren Verbrauch) im Überschuß erfolgen müßte, um eine hohe cytoplasmatische Nitritkonzentration als Triebkraft der Diffusion zu gewährleisten. Dem widerspricht, daß in vivo meist keine signifikanten Nitritkonzentrationen nachgewiesen wurden (5, 32, 125). Dort, wo Meßwerte vorliegen (143), sind die im Licht - also während aktiver Nitratreduktion - gemessenen Werte niedriger als die Dunkelkonzentrationen (Spinat: Dunkel 40-80 μM , Licht 35-65 μM ; Soja: Dunkel 185 μM , Licht 130 μM). Auch bei hoher Nitritbildungsrate könnte man allerdings niedrige Konzentrationen an freiem Nitrit messen, wenn die Envelopemembran einen Akzeptor enthielte, der Nitrit binden und bei Bedarf ins Stroma abgeben kann. Bindung an einen organischen Nitritakzeptor wurde manchmal auch als mögliche Erklärung für die Energieabhängigkeit der Nitritreduktion vorgeschlagen (73, 92). Zusätzlich ist denkbar, daß ein solcher Akzeptor nicht nur freies Nitrit bindet, sondern in erster Linie eine Enzymbindungsstelle für die - nitritbildende - Nitratreduktase oder die - nitritverbrauchende - Nitritreduktase darstellt und so die gezielte Weitergabe der Substanz ermöglicht. Für die Nitratreduktase wurde gelegentlich Assoziation mit der äußeren Envelopemembran gefunden (61, 173, 174). Auf Grund cytochemischer Befunde wurde postuliert, daß sie sich - eingeschlossen in kleine Vesikel - außen an die Chloroplasten anlagert (174); möglicherweise entspricht dem eine Assoziation der Nitritreduktase von innen an die Chloroplastenhüllmembran, so daß gezielte Nitritweitergabe erfolgen kann.

Für weitere Spekulationen bezüglich einer möglichen Funktion der Envelopekomponente wäre eine Zuordnung zu entweder äußerer oder innerer Hüllmembran sicher hilfreich. Bei Erbsenchloropla-

sten, wo eine Trennung der beiden Membranen möglich ist, kann die Nitritreduktion zwar auch gemessen werden, die Raten sind jedoch zu niedrig, als daß sie eine eindeutige Lokalisierung an einer der beiden Membranen erlauben würden. Allenfalls die Tatsache, daß die Envelopekomponente an 70 S - Ribosomen, also im Chloroplasten, translatiert wird (R. Tischner, persönliche Mitteilung), kann einen Anhaltspunkt für die Lokalisation geben: Im Sinne der Endosymbiontentheorie weist dieser Befund auf prokaryontischen Ursprung und kann damit als Hinweis auf eine Lokalisation an der inneren Chloroplastenmembran gedeutet werden. Andererseits kann auch eine Lokalisation im Intermembranraum nicht sicher ausgeschlossen werden.

Ausgangspunkt der zuletzt erörterten Überlegungen waren Hinweise, daß an der Nitratreduktionssequenz neben Nitrataufnahme, Nitratreduktase und Nitritreduktase ein weiterer Faktor beteiligt sein müßte, der für die Nitritausscheidung unter Kohlenstoffmangel verantwortlich ist. Am Envelope wurde eine Komponente gefunden, die in Zusammenhang mit der Nitritverfügbarkeit im Chloroplasten diskutiert wurde. Voraussetzung dafür, daß diese Komponente als Ursache der Nitritausscheidung in Frage kommt, ist, daß sich ihre Aktivität - hier gemessen als artifizielle Nitritreduktion - unter Kohlenstoffmangelbedingungen entsprechend ändert.

Wie bei der Nitritreduktase mißt man für die membrankatalysierte Nitritreduktion bei Luftbegasung niedrigere Raten als bei Begasung mit Luft + 5% CO₂ (Tabelle 10); der Unterschied ist jedoch weniger ausgeprägt als bei der Enzymaktivität. Andererseits beobachtet man nach Verringerung des CO₂-Partialdrucks ein schnelles Absinken der Reduktionsrate (Abbildung 21b); bei vollständigem CO₂-Entzug ist schon nach 30 Minuten nur noch etwa die Hälfte der Ausgangsrate nachweisbar. Die Veränderung der membrankatalysierten Nitritreduktion ist damit die einzige im Algenaufschluß gefundene Veränderung, die ähnlich schnell einsetzt wie die Nitritausscheidung. Bei Erhöhung des CO₂-Partialdrucks kommt es - beginnend wiederum in der ersten halben Stunde - zu einem Überschießen der Aktivität mit einem Maximum nach 4 bis 4.5 Stunden (Abbildung 21a). Nach 24 Stunden ist die Aktivität wieder in die Nähe des Ausgangswertes gesunken, wobei

aber berücksichtigt werden muß, daß das Ergebnis hier durch einen allmählichen Aktivitätsrückgang überlagert wird, wie man ihn mit zunehmendem Alter der Kulturen auch bei ständiger Begasung mit erhöhtem CO₂ findet (Abbildung 23).

Es wurde bereits diskutiert (siehe oben), daß der spät einsetzende Rückgang der Nitritreduktase-Aktivität bei Verringerung des CO₂-Angebots auf eine sekundäre Reaktion hinweist. Wenn die - schnell auf Veränderungen des CO₂-Partialdrucks ansprechende - Membrankomponente tatsächlich die Nitritverfügbarkeit im Chloroplasten reguliert, ließe sich das gut mit den Hinweisen zur Deckung bringen, daß die Nitritreduktase durch ihr eigenes Substrat Nitrit induziert wird (79,165): Bei Erhöhung des CO₂-Drucks steigt zunächst die Aktivität der Membrankomponente und damit das Nitritangebot im Chloroplasten, wo es erhöhte Nitritreduktasesynthese induziert; bei CO₂-Mangel kommt es zum Absinken der Nitritverfügbarkeit, als Folge davon sinkt allmählich dann der Nitritreduktase-Spiegel.

Damit gibt es anscheinend 2 verschiedene Ursachen für die Nitritausscheidung durch *Chlorella fusca* bei Nährstoffmangel:

- Unter Schwefelmangel wird ein starker Rückgang der Nitritreduktase-Aktivität beobachtet, der sich, neben normalen Regulationsmechanismen, durch den hohen Schwefelgehalt des Enzyms erklären läßt. Die Membrankomponente ist hieran wohl nicht beteiligt, da ihre Aktivität mit zunehmendem S-Mangel sogar steigt (Abbildung 22). Diese Erhöhung läßt sich einerseits so erklären, daß die nitritbindende Komponente der Envelopemembranen bei S-Mangel in höherem Maß erhalten bleibt als andere Membranproteine, so daß ihre spezifische Aktivität steigt. Andererseits könnte es sich auch um die Folge einer gesteigerten Synthese der Komponente handeln, wenn im Chloroplasten auf Grund des Nitritreduktase-Rückgangs Mangel an reduziertem Stickstoff auftritt.
- Unter Kohlenstoffmangel scheint der Rückgang der Nitritreduktase-Aktivität nur ein sekundäres, weil zeitlich gegenüber der Nitritausscheidung stark verzögertes Phänomen zu sein. Als Primärursache wird eine - am Envelope regulierte - verringerte Nitritverfügbarkeit im Chloroplasten postuliert.

4.3 Nitritstoffwechsel bei *Synechococcus*

Der Vergleich der bei *Chlorella fusca* erhaltenen Befunde mit entsprechenden Versuchen an der Blaualge *Synechococcus* 6301 (= *Anacystis nidulans*) ergab grundsätzliche Übereinstimmung zwischen Pro- und Eukaryont, sowohl auf der physiologischen Ebene - bezüglich der Nitritausscheidung unter Mangelbedingungen - als auch auf der biochemischen Ebene - bezüglich der membrankatalysierten Nitritreduktion. Obgleich die Nitritreduktase für diesen Organismus als teilweise membrangebunden beschrieben wird (109), fand sich die Aktivität bei den hier verwendeten Aufschlußmethoden ausschließlich im Rohextrakt, der aber sicher noch kleine Membranbruchstücke enthält (vgl. Methoden). Diese Tatsache ermöglichte die ungehinderte Untersuchung der nicht Methylviologen-abhängigen, EDTA-hemmbareren Nitritreduktion auch an *Synechococcus* - Membranen. Die dafür bei *Synechococcus* gemessenen Raten entsprechen in ihrer Größenordnung denen für *Chlorella* (Tabelle 8b).

Nitritausscheidung durch *Synechococcus* unter S-Mangel tritt etwa im gleichen Stadium auf, in dem der Mangel auch äußerlich als drastischer Rückgang des Phycocyanin-Gehalts sichtbar wird. Gleichzeitig mißt man - wie bei *Chlorella* - ein Absinken der Nitritreduktase-Aktivität und einen Anstieg der membrankatalysierten Nitritreduktion. Auch hier scheint also Limitierung des Enzyms Ursache der Nitritausscheidung zu sein.

Sehr deutlich zeigt sich beim Wachstum von *Synechococcus* unter S-Mangel, daß der normale Regulationsmechanismus der Nitrataassimilation - Hemmung der Nitrataufnahme bei hohem Ammoniumangebot (108) - noch funktioniert, daß aber offensichtlich zu wenig Ammonium gebildet wird, um die Nitrataufnahme abzustellen; dadurch kann es überhaupt zur Nitritausscheidung kommen. Setzt man den Kulturen nämlich zu Beginn reduzierten Stickstoff in Form von Ammoniumchlorid oder Harnstoff zu, so beobachtet man keine Nitritausscheidung - wahrscheinlich, weil gar kein Nitrat aufgenommen wird. Bei Zugabe nach Beginn der Nitritausscheidung unterbricht Ammoniumchlorid diese sofort, Harnstoff hat keinerlei Wirkung (Abbildung 30); offensichtlich kann er in diesem Stadium des Mangels nicht mehr aufgenommen

oder verwertet werden.

Auch bei Luftbegasung scheidet *Synechococcus* ab einer bestimmten Kulturdichte Nitrit aus, das nach Erhöhung des CO₂-Partialdrucks langfristig wieder aufgenommen wird. Im Vergleich zu *Chlorella*, wo die Umstellungen im Nitritstoffwechsel innerhalb einer halben Stunde nach Veränderung des CO₂-Partialdrucks einsetzen, geschehen sie hier jedoch langsamer, innerhalb einiger Stunden. Das sind Zeiträume in denen - gerade bei Prokaryonten - grundlegende Veränderungen im Enzymmuster erfolgen können. Kurzzeitige Untersuchungen des Enzymverhaltens, wie sie für *Chlorella* nach Veränderung des CO₂-Angebots durchgeführt wurden (Abbildung 13 und 21), sind für *Synechococcus* nicht durchführbar bzw. wenig sinnvoll:

- Da sich Veränderungen bezüglich Nitritaufnahme oder -ausscheidung oft erst mit mehrstündiger Verzögerung zeigen, läßt sich der für entsprechende Versuche entscheidende Zeitraum kaum vorhersagen.
- Aus dem gleichen Grund ist auch nicht gewährleistet, daß verschiedene parallel gewachsene Batch-Kulturen sich so "synchron" verhalten, daß man daraus eine Meßreihe ableiten kann.
- Schließlich reagiert *Synechococcus* auf den CO₂-Mangel bei Luftbegasung sehr viel empfindlicher als *Chlorella*, so daß man gelegentlich nicht nur eine starke Verlangsamung des Wachstums sondern plötzlichen Stillstand verbunden mit auffallendem Rückgang im Phycocyanin-Gehalt oder sogar Absterben einzelner Kulturen beobachtet. Ursache hierfür ist möglicherweise eine geringere Toleranz der Blaualgen gegenüber dem hohen pH-Wert des Mediums bei Luftbegasung; denn mit MOPSO im Neutralbereich gepufferte Kulturen zeigten deutlich regelmäßigeres Wachstum.

Im Gegensatz zu *Chlorella* scheint die Membrankomponente für die Nitritausscheidung bei *Synechococcus* keine Rolle zu spielen. Denn sie zeigt hier, wie bei S-Mangel, auch mit verstärktem CO₂-Mangel zunehmende Aktivität, während die Nitritreduktase-Aktivität erniedrigt ist (Tabelle 13). Das widerspricht nicht der bei *Chlorella* postulierten Funktion, da man die strenge räumliche Trennung zwischen Nitrat- und Nitritreduktion in

Blaualggen nicht findet: Die Nitratreduktase ist membrangebunden (61,103) und bezieht die für die Reduktion nötigen Elektronen wie die Nitritreduktase von Ferredoxin (61).

Der einfachere Aufbau der Blaualggen ist auch Voraussetzung für einen sehr eindrucksvollen Unterschied zwischen *Chlorella* und *Synechococcus*: Wird zu *Synechococcus* - Kulturen, die mit erhöhtem CO_2 begast wurden und die in Folge dessen nitritfrei sind, von außen Nitrit zugesetzt, so wird binnen weniger Minuten Ammonium in großen Mengen ins Medium ausgeschieden (Abbildung 29) - solange, bis kein Nitrit mehr vorhanden ist; danach wird das Ammonium allmählich wieder aufgenommen. Offensichtlich ist die Reduktion von Nitrit bei Adaptation an hohes CO_2 in weit größerem Ausmaß möglich als der Einbau von Ammonium. Gleichzeitig wird deutlich, daß der Nitrit-Influx unter diesen Bedingungen nicht durch Ammonium gehemmt wird. Wahrscheinlich erfolgt er hier tatsächlich nur über Diffusion von HNO_2 , getrieben durch die sofortige Reduktion im Inneren. Denn für Blaualggen wurde beschrieben, daß sich der Nitrittransport aus den 2 Komponenten Diffusion und aktiver Transport - wahrscheinlich über den Nitratcarrier - zusammensetzt (53,108), wobei im Neutralen die Diffusion, im Alkalischen die aktive Aufnahme überwiegt (53). Bei *Chlorella*, wo das Nitrit Plasmalemma und Envelope durchdringen muß, findet man im entsprechenden Versuch höchstens Ammoniumausscheidung von einigen μMol (Abbildung 10). Daß *Synechococcus* bei Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks von 0.035% auf 5% Nitrit ohne begleitende Ammoniumexkretion aufnimmt, unterstreicht damit noch einmal, daß nach vorausgegangenem CO_2 -Mangel die Nitritreduktase limitierend wirkt.

4.4. Ausblick

Bei Laboranzucht in Batch-Kulturen scheiden die Grünalge *Chlorella fusca* und das Cyanobakterium *Synechococcus* 6301 unter Schwefel- oder Kohlenstoffmangelbedingungen Nitrit - und erst viel später und in geringen Konzentrationen auch Ammonium - aus. Ursache dafür ist offensichtlich eine Störung der Weiterreduktion des Nitrits, entweder direkt auf Enzymebene oder bei der Nitritbereitstellung für diese Weiterreduktion. Ob Bedin-

ungen, die zu entsprechenden Mangelzuständen führen - Voraussetzung ist neben einer Nährstofflimitierung eine gewisse Lichtintensität (Abbildung 3) - auch beim natürlichen Wachstum auftreten können, läßt sich kaum abschätzen. Bei Untersuchungen an verschiedenen Gewässern in der Umgebung Münchens wurden sehr geringe Konzentrationen an Nitrit (bis 6.5 μM) gefunden; über dessen Herkunft ist jedoch keine Aussage möglich.

Sollten Algen in höheren Konzentrationen Nitrit bilden, ist darüber hinaus denkbar, daß sie zur Stickoxidproduktion beitragen. Für Grün- und Blaualgen (auch für *Chlorella*, aber nicht für *Anacystis* 6308) wurde gezeigt, daß sie bei Wachstum auf Nitrit Lachgas (N_2O) abgeben (179,180). Unter den hier verwendeten Wachstumsbedingungen konnte N_2O -Produktion aber auch für *Chlorella* nicht nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die nach CO_2 -Limitierung rasch einsetzende Nitritausscheidung läßt sich durch gleichzeitig gemessene Veränderungen in den Aktivitäten von Nitrat- und Nitritreduktase kaum erklären. Als möglicher Angriffspunkt wurde eine nitritbindende Komponente der Envelopemembranen vorgeschlagen, die in vitro durch artifizielle, Dithionit-abhängige Reduktion des gebundenen Nitrits nachweisbar ist. Die Nachweisbarkeit dieser Komponente ist von plastidärer, nicht aber von cytoplasmatischer Translation abhängig; denn sie wird durch Lincomycin (einen Hemmstoff der Translation an 70 S - Ribosomen) und nicht durch Cycloheximid, das an 80 S - Ribosomen angreift, gehemmt (Tischner, persönliche Mitteilung). Damit unterscheidet sie sich von den Enzymen der Nitratassimilation, die alle - einschließlich der im Chloroplasten lokalisierten - im Cytoplasma synthetisiert werden (18,45,162). Im Sinne der Endosymbiontentheorie sollte die Envelopekomponente also prokaryontischen Ursprungs sein. Beim Vergleich der vorliegenden Befunde mit Literaturdaten kommen 2 prokaryontische Systeme als Ursprung in Frage:

1. An *Synechococcus*-Membranen wurde ebenfalls - und mit ähnlichen Raten wie bei *Chlorella* - Dithionit-abhängige, EDTA-hemmbar Nitritreduktion gefunden, die nicht der cyanobakteriellen Nitritreduktase entstammt. Daneben existieren für *Synechococcus* (= *Anacystis nidulans*) gute Hinweise auf aktive

Nitritaufnahme (53,108), allerdings wahrscheinlich nicht über einen eigenen, sondern über den Nitratcarrier (108). Ob beide Systeme zusammenhängen und so einen möglichen Ursprung der Membrankomponente bei *Chlorella* darstellen, darüber sind bisher keine Aussagen möglich.

2. Ein anderer Hinweis ergibt sich aus den biochemischen Ähnlichkeiten, die zwischen der Nitritreduktion am Envelope und der dissimilatorischen Nitritreduktase bei *Pseudomonas aureofaciens* (183) bestehen. Die dissimilatorische Nitratreduktion der Bakterien findet im Bereich der Cytoplasmamembran und des periplasmatischen Raumes statt, wobei die genaue räumliche Orientierung der Enzyme noch umstritten ist (19). In der Regel scheint die nitratreduzierende Aktivität dem Cytoplasma zugewandt zu sein, während die weiterreduzierenden Enzyme häufig im periplasmatischen Raum lokalisiert sind (24,46,76). In diesem Fall ist wie am Chloroplasten Nitrittransport nötig, wenn auch von innen nach außen. Es wäre denkbar, daß die nitritbindende Envelopekomponente ein Überrest aus dem Komplex der dissimilatorischen Nitratreduktion bei Prokaryonten ist, was auch die biochemischen Ähnlichkeiten bezüglich der Nitritreduktion (s. oben) erklären könnte. In photosynthetischen Eukaryonten müßte dann ein Funktionswechsel erfolgt sein, so daß die Komponente dort den Nitrittransport zwischen Cytoplasma und Chloroplasten im Rahmen der Nitratassimilation vermittelt. Dissimilatorische Nitratreduktion kommt auch bei einigen photosynthetischen Bakterien vor (z.B. *Rhodopseudomonas sphaeroides* f.sp. *denitrificans* und *Rhodopseudomonas capsulata*). Hier liegen die Nitratreduktase - und oft auch die Folgeenzyme - anscheinend im periplasmatischen Raum (46). In einem Fall scheinen sogar ähnliche räumliche Verhältnisse aufzutreten wie bei der Nitratreduktion eukaryontischer photosynthetischer Organismen: Bei Mutanten von *Rhodopseudomonas capsulata* ist die assimilatorische Nitratreduktase verlorengegangen und die dissimilatorische konstitutiv geworden (112). Da diese Mutanten aber noch Stickstoff-autotroph sind (112), muß hier das im periplasmatischen Raum gebildete Nitrit zur weiteren Assimilation durch die Hüllmembran in das Innere der Bakterien gelangen.

Eine am Envelope lokalisierte Komponente, die kontrollierten

Nitrittransport in den Chloroplasten ermöglicht, könnte im Hinblick auf die hier dargestellten Ergebnisse von zweierlei Bedeutung sein:

1. Es erscheint sinnvoll, daß der Transport von Nitrit zwischen der Entstehung durch die cytoplasmatische Nitratreduktase-Reaktion und der Weiterreduktion durch die plastidäre Nitritreduktase nicht allein von Diffusion abhängig ist, sondern daß eine gezielte Weitergabe erfolgt, um die Konzentration des toxischen Ions möglichst gering zu halten.

2. Eine auch dissimilatorische Funktion der Nitratreduktion wurde für höhere Pflanzen und Algen gelegentlich postuliert (6,8,11). Unter bestimmten Wachstumsbedingungen - wenn nämlich durch hohe Lichtintensität und einen Mangel an assimilierbarem Kohlenstoff ein Überangebot an Reduktionsäquivalenten zur Verfügung steht - stellt die Nitratreduktion die einzige mengenmäßig bedeutende Möglichkeit zur Ableitung der Elektronen und damit zum Schutz vor Photoinhibition bzw. -oxidation dar.

Durchreduktion des Nitrats bis zum Ammonium und dessen Ausscheidung, wie man es in einigen Fällen findet (7,100), stellt dabei die im Hinblick auf ihren Elektronenbedarf effektivere Form der Dissimilation dar. In der auch dissimilatorischen Nitratreduktion könnte der Grund dafür liegen, daß die Nitrataufnahme nicht über Ammonium selbst sondern über ein organisches Folgeprodukt seines Einbaus reguliert wird: Dadurch bleibt dissimilatorische Ammoniumproduktion möglich, bei hohen Konzentrationen an eingebautem Ammonium wird die Nitrataufnahme aber unterbrochen.

Bei anderen Algen oder unter bestimmten Wachstumsbedingungen endet die dissimilatorische Nitratreduktion zunächst mit der Ausscheidung von Nitrit. Dabei ist der Elektronenbedarf zwar wesentlich geringer als bei der Reduktion bis zum Ammonium; andererseits wird verhindert, daß sich eine der toxischen Substanzen Nitrit oder Ammonium im Chloroplasten anhäuft, wo sie Energiehaushalt und Enzymfunktion erheblich stören würden. Voraussetzung dafür, daß die dissimilatorische Nitritproduktion für die Algen unschädlich bleibt, ist allerdings, daß sie die Diffusion des Nitrits (bzw. von salpetriger Säure) in den Chloroplasten verhindern und es stattdessen ausscheiden können.

Jede der beiden hier genannten Funktionen der Nitritbildung, die assimilatorische wie die "dissimilatorische", läßt einen durch die Zellen kontrollierbaren Nitrittransport in den Chloroplasten notwendig erscheinen.

5 Zusammenfassung

1. *Chlorella fusca* scheidet unter Schwefelmangelbedingungen Zwischenprodukte der Nitrataassimilation in das Kulturmedium aus. Nitrit wird früher und in höheren Konzentrationen ausgeschieden als Ammonium.

2. Etwa 2 Stunden nach Zugabe einer verwertbaren S-Quelle setzt Nitritaufnahme ein.

3. Die Nitritexkretion unter S-Mangel kann durch die unter diesen Bedingungen drastisch verringerte Nitritreduktase-Aktivität erklärt werden.

4. Auch unter Kohlenstoffmangel-Bedingungen scheidet *Chlorella fusca* Nitrit aus. Kohlenstoffmangel herrscht, wenn dichtere Kulturen mit Luft ohne Zusatz von CO_2 begast werden. Die Nitritkonzentration betrug in diesem Fall nach fünftägigem Wachstum bis zu 6 mM.

5. Nach Erhöhung des CO_2 -Partialdrucks wird in C-Mangelkulturen sehr rasche Nitritaufnahme beobachtet, die spätestens 30 Minuten nach Erhöhung des CO_2 -Angebots beginnt.

Eine ähnlich kurze Zeitspanne vergeht nach Verringerung des CO_2 -Partialdrucks von 5% auf 0.035% bis zum Beginn der Nitritausscheidung.

5. Die Daten zur Nitritaufnahme bei hohem CO_2 -Partialdruck zeigen eindeutig, daß die Nitritaufnahme durch *Chlorella* bei hoher Ammoniumverfügbarkeit gehemmt wird. Auch der Nitrittransport muß also kontrolliert erfolgen.

6. Bei Veränderung des CO_2 -Angebots werden Veränderungen der Enzymaktivität erst nach Stunden meßbar - im Gegensatz zu den innerhalb einer halben Stunde beobachteten Veränderungen der Nitritkonzentration im Medium. Diese Tatsache führte zur Suche nach weiteren Faktoren, die die Geschwindigkeit der Nitritreduktion beeinflussen könnten.

7. An Envelopemembranen wurde eine artifizielle, Dithionit-abhängige Nitritreduktion gemessen. Das läßt den Schluß zu, daß die Envelopemembranen eine Komponente enthalten, die Nitrit binden und so die Reduktion katalysieren kann.

8. Die Regulation der Envelopekomponente durch die Ernährungsbedingungen weist auf eine Funktion im N-Stoffwechsel hin.

9. Nach Veränderungen des CO₂-Partialdrucks beobachtet man für die nitritreduzierende Aktivität der Membrankomponente ähnlich schnelle Veränderungen wie für die Nitritkonzentration im Medium.

10. Auf Grund der verfügbaren Daten wird eine Beteiligung der Envelopekomponente an der Vermittlung von Nitrit zwischen der Bildung durch die Nitratreduktase-Reaktion im Cytoplasma und der Weiterreduktion durch die Nitritreduktase im Chloroplasten-Stroma angenommen.

11. Die bei der Grünalge *Chlorella fusca* erhaltenen Befunde sind im wesentlichen auf das Cyanobakterium *Synechococcus* 6301 übertragbar.

12. Die Bedeutung der Nitritausscheidung unter C-Mangel-Bedingungen als Schutz gegen Photoinhibitionsprozesse wird diskutiert.

6 Literaturverzeichnis

- 1) Abe, T., Tsuzuki, M., Kaplan, A., Miyachi, S. (1987) Transport and fixation of inorganic carbon during photosynthesis in the cells of *Anabaena* grown under ordinary air. II. Effect of sodium concentration during growth on the induction of active transport system for IC. *Plant Cell Physiol.* 28, 671-677
- 2) Ahmed, J., Morris, J. (1968) The effects of 2,4 - Dinitrophenol and other uncoupling reagents on the assimilation of nitrate and nitrite by *Chlorella*. *Biochim. Biophys. Acta* 162, 32-38
- 3) Aizawa, K., Miyachi, S. (1986) Carbonic anhydrase and CO₂ concentrating mechanisms in microalgae and cyanobacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 215-233
- 4) von Arb, C., Brunold, C. (1985) Fd-sulfite and Fd-nitrite reductase activities in leaves of *Pisum sativum*: Changes during ontogeny and in vitro regulation by sulfide. *Physiol. Plant.* 64, 290-294
- 5) Aslam, M., Huffaker, R.C. (1984) Dependency of nitrate reduction on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. *Plant Physiol.* 75, 623-628
- 6) Azuara, M.P., Aparicio, P.J. (1983) In vivo blue light activation of *Chlamydomonas reinhardtii* nitrate reductase. *Plant Physiol.* 71, 286-290
- 7) Azuara, M.P., Aparicio, P.J. (1984) Effects of light quality, CO₂ tensions and NO₃⁻ concentrations on the inorganic nitrogen metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.* 5, 97-103

- 8) Azuara, M.P., Aparicio, P.J. (1985) Spectral dependence of photoregulation of inorganic nitrogen metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 77, 95-98
- 9) Balandin, T., Aparicio, P.J. (1987) Hydroxylamine metabolism in *Monoraphidium braunii*. I. Its interference with the utilization of NH_4^+ and NO_2^- . New Phytol. 107, 513-522
- 10) Balandin, T., Aparicio, P.J. (1987) Hydroxylamine metabolism in *Monoraphidium braunii*. II. Its interference with the utilization of NO_3^- . New Phytol. 107, 523-530
- 11) Balandin, T., Fernández, V.M., Aparicio, P.J. (1986) Characterization of the reversible inactivation of *Ankistrodesmus braunii* nitrate reductase by hydroxylamine. Plant Physiol. 82, 65-70
- 12) Barneix, A.J., James, D.M., Watson, E.F., Hewitt, E.J. (1984) Some effects of nitrate abundance and starvation on metabolism and accumulation of nitrogen in barley. Planta 162, 469-476
- 13) Baysdorfer, C., Robinson, J.M. (1985) Metabolic interactions between spinach leaf nitrite reductase and ferredoxin-NADP reductase. Competition for reduced ferredoxin. Plant Physiol. 77, 318-320
- 14) Beevers, L., Hageman, R.H. (1969) Nitrate reduction in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 20, 495-522
- 15) Beevers, L., Hageman, R.H. (1980) Nitrate and nitrite reduction. in: Biochemistry of Plants, Band 5: Amino Acids and Derivatives, Hrg. B.J. Mifflin. Academic Press New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco; S. 115-168
- 16) Biedlingmaier, S. (1986) Aufnahme und Metabolisierung kurzkettiger Sulfonsäuren in der Grünalge *Chlorella fusca*. Dissertation, Universität München.

- 17) Biedlingmaier, S., Köst, H.-P., Schmidt, A. (1986)
Utilization of sulfonic acids as the only sulfur source
for growth of photosynthetic organisms.
Planta 169, 518-523

- 18) Börner, T., Mendel, R.R., Schiemann, J. (1986) Nitrate
reductase is not accumulated in chloroplast-ribosome-defi-
cient mutants of higher plants. *Planta* 169, 202-207

- 19) Bothe, H. (1987) Metabolism of inorganic nitrogen com-
pounds. in: *Progress in Botany* 49, Hrg. H.-D. Behnke, K.
Esser, K. Kubitzki, M. Runge, H. Ziegler. Springer Berlin,
Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo; S. 103-116

- 20) Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the
quantitation of microgram quantities of protein utilizing
the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72, 248-254

- 21) Breteler, H., Luczak, W. (1982) Utilization of nitrite and
nitrate by dwarf bean. *Planta* 156, 226-232

- 22) Brownell, P.F., Nicholas, D.J.D. (1967) Some effects of
sodium on nitrate assimilation and N₂ fixation in *Anabaena*
cyindrica. *Plant Physiol.* 42, 915-921

- 23) Buchanan, B.B. (1980) Role of light in the regulation of
chloroplast enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 31, 341-374

- 24) Byrne, M.D., Nicholas, D.J.D. (1987) A membrane-bound
dissimilatory nitrate reductase from *Rhodobacter sphaero-*
ides f.sp. *denitrificans*.
Biochim. Biophys. Acta 915, 120-124

- 25) Candau, P., Manzano, C., Losada, M. (1976) Bioconversion
of light energy into chemical energy through reduction
with water of nitrate to ammonia. *Nature* 262, 715-717

- 26) Canvin, D.T., Atkins, C.A. (1974) Nitrate, nitrite and ammonia assimilation by leaves: Effect of light, carbon dioxide and oxygen. *Planta* 116, 207-224
- 27) Carpenter, C.E., Reddy, D.S.A., Cornforth, D.P. (1987) Inactivation of clostridial ferredoxin and pyruvate-ferredoxin oxidoreductase by sodium nitrite. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 549-552
- 28) Clarkson, D.T. (1986) Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells: A review of current ideas and methodology. in: Fundamental, ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants, Hrg. H. Lambers, J.J. Neeteson, I. Stulen. Martinus Nijhoff Publishers Dordrecht, Boston, Lancaster; S. 3-27
- 29) Cline, K., Andrews, J., Mersey, B., Newcomb, E.H., Keegstra, K. (1981) Separation and characterization of inner and outer envelope membranes of pea chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 3595-3599
- 30) Córdoba, F., Cárdenas, J., Fernández, E. (1986) Kinetic characterization of nitrite uptake and reduction by *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 82, 904-908
- 31) Córdoba, F., Cárdenas, J., Fernández, E. (1987) Cooperative regulation by ammonium and ammonium derivatives of nitrite uptake in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta* 902, 287-292
- 32) Cresswell, R.C., Syrett, P.J. (1982) The uptake of nitrite by the diatom *Phaeodactylum*. Interactions between nitrite and nitrate. *J. Exp. Bot.* 33, 1111-1121
- 33) Cullimore, J.V., Sims, A.P. (1980) An association between photorespiration and protein catabolism: studies with *Chlamydomonas*. *Planta* 150, 392-396

- 34) Cullimore, J.V., Sims, A.P. (1981) Pathway of ammonia assimilation in illuminated and darkened *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 20, 933-940
- 35) Cullimore, J.V., Sims, A.P. (1981) Glutamine synthetase of *Chlamydomonas*: its role in the control of nitrate assimilation. *Planta* 153, 18-24
- 36) Davis, E.A. (1953) Nitrate reduction by *Chlorella*. *Plant Physiol.* 28, 539-544
- 37) Deane-Drummond, C.E. (1984) Mechanism of nitrate uptake into *Chara corallina* cells: lack of evidence for obligatory coupling to proton pump and a new $\text{NO}_3^-/\text{NO}_3^-$ exchange model. *Plant Cell Environ.* 7, 317-323
- 38) Deane-Drummond, C.E. (1985) Regulation of nitrate uptake into *Chara corallina* cells via NH_4^+ stimulation of NO_3^- efflux. *Plant Cell Environ.* 8, 105-110
- 39) Dickinson, R.E., Cicerone, R.J. (1986) Future global warming from atmospheric trace gases. *Nature* 319, 109-115
- 40) Diez, J., Chaparro, A., Vega, J.M., Relimpio, A. (1977) Studies on the regulation of assimilatory nitrate reductase in *Ankistrodesmus braunii*. *Planta* 137, 231-234
- 41) Duke, S.H., Duke, S.O. (1984) Light control of extractable nitrate reductase activity in higher plants. *Physiol. Plant.* 62, 485-493
- 42) Eisele, R., Ullrich, W.R. (1975) Stoichiometry between photosynthetic nitrate reduction and alkalisation by *Ankistrodesmus braunii* in vivo. *Planta* 123, 117-123
- 43) Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77

- 44) Enser, U., Heber, U. (1980) Metabolic regulation by pH gradients. Inhibition of photosynthesis by indirect proton transfer across the chloroplast envelope. *Biochim. Biophys. Acta* 592, 577-591
- 45) Feierabend, J. (1986) Investigation of the site of synthesis of chloroplastic enzymes of nitrogen metabolism by the use of heat-treated 70 S ribosome deficient rye leaves. *Physiol. Plant.* 67, 145-150
- 46) Ferguson, S.J. (1987) Denitrification: a question of the control and organization of electron and ion transport. *Trends Biochem. Sci.* 12, 354-357
- 47) Ferguson, W.J., Braunschweiger, K.I., Braunschweiger, W.R., Smith, J.R., McCormick, J.J., Wasmann, C.C., Jarvis, N.P., Bell, D.H., Good, N.E. (1980) Hydrogen ion buffers for biological research. *Anal. Biochem.* 104, 300-310
- 48) Finkelstein, E., Rosen, G.M., Rauckman, E.J. (1984) Superoxide-dependent reduction of nitroxides by thiols. *Biochim. Biophys. Acta* 802, 90-98
- 49) Florencio, F.J., Vega, J.M. (1982) Regulation of the assimilation of nitrate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry* 21, 1195-1200
- 50) Florencio, F.J., Vega, J.M. (1983) Utilization of nitrate, nitrite and ammonium by *Chlamydomonas reinhardtii*. Photoproduction of ammonia. *Planta* 158, 288-293
- 51) Flores, E., Guerrero, M.G., Losada, M. (1980) Short-term ammonium inhibition of nitrate utilization by *Anacystis nidulans* and other cyanobacteria. *Arch. Microbiol.* 128, 137-144

- 52) Flores, E., Guerrero, M.G., Losada, M. (1983) Photosynthetic nature of nitrate uptake and reduction in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*.
Biochim. Biophys. Acta 722, 408-416
- 53) Flores, E., Herrero, A., Guerrero, M.G. (1987) Nitrite uptake and its regulation in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Biochim. Biophys. Acta 896, 103-108
- 54) Flores, E., Ramos, J.L., Herrero, A., Guerrero, M.G. (1983) Nitrate assimilation by cyanobacteria. in: Photosynthetic Prokaryotes: Cell differentiation and function, Hrg. G.C. Papageorgiou, L. Packer. Elsevier Amsterdam; S. 363-387
- 55) Fowler, M.W., Jessup, w., Sarkissian, G.S. (1974) Glutamate synthase type activity in higher plants.
FEBS Lett. 46, 340-342
- 56) Friedrich, J.W., Schrader, L.E. (1978) Sulphur deprivation and nitrogen metabolism in maize seedlings.
Plant Physiol. 61, 900-903
- 57) Gaitonde, M.K. (1967) A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. Biochem. J. 104, 627-633
- 58) Giotta, G.J., Wang, H.H. (1972) Reduction of nitroxide free radicals by biological materials.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 46, 1576-1580
- 59) Good, N.E., Izawa, S. (1972) Hydrogen ion buffers.
Meth. Enzymol. 24, 53-68
- 60) Guerrero, M.G., Manzano, C., Losada, M. (1974) Nitrite photoreduction by a cell-free preparation of *Anacystis nidulans*. Plant Sci. Lett. 3, 273-278

- 61) Guerrero, M.G., Vega, J.M., Losada, M. (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. *Ann. Rev. Plant Physiol* 32, 169-204
- 62) Gupta, S.C., Beevers, L. (1985) Regulation of synthesis of nitrite reductase in pea leaves: in-vivo and in-vitro studies. *Planta* 166, 89-95
- 63) Gutteridge, J.M.C. (1987) A method for removal of trace iron contamination from biological buffers. *FEBS Lett.* 214, 362-364
- 64) Haass, D., Tanner, W. (1974) Regulation of Hexose Transport in *Chlorella vulgaris*. Characteristics of induction and turnover. *Plant Physiol.* 53, 14-20
- 65) Hageman, R.H., Cresswell, C.F., Hewitt, E.J. (1962) Reduction of Nitrate, nitrite and hydroxylamine to ammonia by enzymes extracted from higher Plants. *Nature* 193, 247-250
- 66) Heber, U., Heldt, H.W. (1981) The chloroplast envelope: structure, function, and role in leaf metabolism. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32, 139-168
- 67) Heldt, H.W. (1976) Metabolite transport in intact spinach chloroplasts. in: *The Intact Chloroplast*, Hrg. J. Barber. Elsevier North-Holland Biomedical Press Amsterdam; S. 215-234
- 68) Heldt, H.W., Flügge, U.I. (1986) Transport of metabolites across the chloroplast envelope. *Meth. Enzymol.* 125, 705-716
- 69) Heldt, H.W., Sauer, F. (1971) The inner membrane of the chloroplast envelope as the site of specific metabolite transfer. *Biochim. Biophys. Acta* 234, 83-91

- 70) Hewitt, E.J., James, D.M., Eaglesham, A.R.J. (1975) The non-enzymic reduction of nitrite by benzylviologen (free radical) in the presence and absence of ammonium sulphate. *Mol. Cell. Biochem.* 6, 101-105
- 71) Hiller, R.G., Bassham, J.A. (1965) Inhibition of CO₂ fixation by nitrous acid. *Biochim. Biophys. Acta* 109, 607-610
- 72) Hirasawa, M., Shaw, R.W., Palmer, G., Knaff, D.B. (1987) Prosthetic group content and ligand-binding properties of spinach nitrite reductase. *J. Biol. Chem.* 262, 12428-12433
- 73) Hofmann, A. (1972) Über die energetische Kopplung der Nitritassimilation von Grünalgen an Atmung und Photosynthese. *Planta* 102, 72-84
- 74) Huzisige, H., Satoh, K. (1961) Photosynthetic nitrite reductase. I. Partial purification and properties of the enzyme from spinach leaves. *Bot. Mag. Tokyo* 74, 178-185
- 75) Huzisige, H., Satoh, K., Tanaka, K., Hayasida, T. (1963) Photosynthetic nitrite reductase. II. Further purification and biochemical properties of the enzyme. *Plant Cell Physiol.* 4, 307-322
- 76) Ingledew, W.J., Poole, R.K. (1984) The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 48, 222-271
- 77) Johnson, C.B. (1976) Rapid activation by phytochrome of nitrate reductase in the cotyledons of *Sinapis alba*. *Planta* 128, 127-131
- 78) Jones, R.W., Sheard, R.W. (1978) Accumulation and stability of nitrite in intact aerial leaves. *Plant Sci. Lett.* 11, 285-291

- 79) Jordan, D.B., Fletcher, J.S. (1979) The relationship between NO_2^- accumulation, nitrate reductase and nitrite reductase in suspension cultures of Paul's scarlet rose. *Plant Sci. Lett.* 17, 95-99
- 80) Joy, K.W., Hageman, R.H. (1966) The purification and properties of nitrite reductase from higher plants, and its dependence on ferredoxin. *Biochem. J.* 100, 263-273
- 81) Kaiser, G., Heber, U. (1983) Photosynthesis of leaf cell protoplasts and permeability of the plasmalemma to some solutes. *Planta* 157, 462-470
- 82) Kamachi, K., Amemiya, Y., Ogura, N., Nakagawa, H. (1987) Immuno-gold localization of nitrate reductase in spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Plant Cell Physiol.* 28, 333-338
- 83) Kaplan, A., Volokita, M., Zenvirth, D., Reinhold, L. (1984) An essential role for sodium in the bicarbonate transporting system of the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *FEBS Lett.* 176, 166-168
- 84) Kay, C.J., Barber, M.J. (1986) Assimilatory nitrate reductase from *Chlorella*. *J. Biol. Chem.* 261, 14125-14129
- 85) Kelker, H.C., Filner, P. (1971) Regulation of nitrite reductase and its relationship to the regulation of nitrate reductase in cultured tobacco cells. *Biochim. Biophys. Acta* 252, 69-82
- 86) Kessler, E. (1952) Nitritbildung und Atmung bei der Nitratreduktion von Grünalgen. *Z. Naturforschg.* 7b, 280-284
- 87) Kessler, E. (1953) Über den Mechanismus der Nitratreduktion von Grünalgen. II. Vergleichend-physiologische Untersuchungen. *Arch. Mikrobiol.* 19, 438-457

- 88) Kessler, E. (1955) Über die Wirkung von 2,4 - Dinitrophenol auf Nitratreduktion und Atmung von Grünalgen.
Planta 45, 94-105
- 89) Kessler, E. (1957) Untersuchungen zum Problem der photochemischen Nitratreduktion in Grünalgen.
Planta 49, 505-523
- 90) Kessler, E. (1964) Nitrate assimilation by plants.
Ann. Rev. Plant Physiol. 15, 57-72
- 91) Kessler, E., Czygan, F.C. (1963) Seasonal changes in the nitrate-reducing activity of a green alga.
Experientia 19, 89-90
- 92) Kessler, E., Hofmann, A., Zumft, W.G. (1970) Inhibition of nitrite assimilation by uncouplers of phosphorylation.
Arch. Mikrobiol. 72, 23-26
- 93) Keys, A.J., Bird, I.F., Cornelius, M.J., Lea, P.J., Wallsgrove, R.M., Mifflin, B.J. (1978) Photorespiratory nitrogen cycle. Nature 275, 741-743
- 94) Klepper, L.A. (1987) Nitric oxide emissions from soybean leaves during in vivo nitrate reductase assay.
Plant Physiol. 85, 96-99
- 95) Krauss, K.F. (1984) Funktion, Eigenschaften und Regulation der multifunktionalen Cysteinsynthese und einiger am Cysteinestoffwechsel beteiligter Enzyme beim Wachstum von *Chlorella fusca* auf verschiedenen schwefelhaltigen Verbindungen. Dissertation, Universität München.
- 96) Kundu, B., Nicholas, D.J.D. (1985) Proton translocation during denitrification in *Rhodopseudomonas sphaeroides* f. *denitrificans*. Arch. Mikrobiol. 140, 358-364

- 97) Larsson, M., Ingemarsson, B., Larsson, C.-M. (1982)
Photosynthetic energy supply for NO_3^- assimilation in
Scenedesmus. *Physiol. Plant.* 55, 301-308
- 98) Larsson, M., Larsson, C.-M., Guerrero, M.G. (1985)
Photosynthetic nitrogen metabolism in high and low CO_2 -
adapted *Scenedesmus*. I. Inorganic carbon-dependent O_2 -
evolution, nitrate utilization and nitrogen recycling.
J. Exp. Bot. 36, 1373-1386
- 99) Larsson, C.-M., Larsson, M., Guerrero, M.G. (1985)
Photosynthetic nitrogen metabolism in high and low CO_2 -
adapted *Scenedesmus*. II. Effect of ammonium and methionine
sulphoximine on nitrate utilization.
J. Exp. Bot. 36, 1387-1395
- 100) Larsson, M., Olsson, T., Larsson, C.-M. (1985) Distribu-
tion of reducing power between photosynthetic carbon and
nitrogen assimilation in *Scenedesmus*. *Planta* 164, 246-253
- 101) Lea, P.J., Mifflin, B.J. (1974) Alternative route for
nitrogen assimilation in higher plants.
Nature 251, 614-616
- 102) Losada, M. (1976) Metalloenzymes of the nitrate-reducing
system. *J. Mol. Catal.* 1, 245-264
- 103) Losada, M., Guerrero, M.G., Vega, J.M. (1981) The assi-
milatory reduction of nitrate. in: *Biology of Inorganic
Nitrogen and Sulfur*, Hrg. H. Bothe, A. Trebst. Springer
Berlin, Heidelberg, New York; S. 30-63
- 104) Losada, M., Herrera, J., Maldonado, J.M., Paneque, A.
(1973) Mechanism of nitrate reductase reversible inacti-
vation by ammonia in *Chlamydomonas*.
Plant Sci. Lett. 1, 31-37

- 105) Losada, M., Paneque, A., Ramirez, J.M., del Campo, F.F. (1963) Mechanism of nitrite reduction in chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 10, 298-303
- 106) Losada, M., Vega, J.M., Guerrero, M.G. (1981) The photo-synthetic assimilation of nitrate and its regulation. in: *Photosynthesis IV. Regulation of Carbon Metabolism*, Hrg. G. Akoyunoglou. Balaban International Science Services, Philadelphia, Pa; S. 693-705
- 107) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- 108) Madueño, F., Flores, E., Guerrero, M.G. (1987) Competition between nitrate and nitrite uptake in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta* 896, 109-112
- 109) Manzano, C., Candau, P., Gómez-Moreno, C., Relimpio, A.M., Losada, M. (1976) Ferredoxin-dependent photosynthetic reduction of nitrate and nitrite by particles of *Anacystis nidulans*. *Mol. Cell. Biochem.* 10, 161-169
- 110) Di Martino Rigano, V., Martello, A., di Martino, C., Rigano, C. (1985) Effect of CO₂ and phosphate deprivation on the control of nitrate, nitrite and ammonium metabolism in *Chlorella*. *Physiol. Plant.* 63, 241-246
- 111) Di Martino Rigano, V., Vona, V., di Martino, C., Rigano, C. (1986) Effect of darkness and CO₂ starvation on NH₄⁺ and NO₃⁻ assimilation in the unicellular alga *Cyanidium caldarium*. *Physiol. Plant.* 68, 34-38
- 112) McEwan, A.G., Jackson, J.B., Ferguson, S.J. (1984) Rationalization of properties of nitrate reductase in *Rhodopseudomonas capsulata*. *Arch. Microbiol.* 137, 344-349

- 113) Medina, A., Nicholas, D.J.D. (1957) Interference by reduced pyridine nucleotides in the diazotation of nitrite. *Biochim. Biophys. Acta* 33, 440-442
- 114) Merkel, J.R., Nickerson, W.J. (1954) Riboflavin as a photocatalyst and hydrogen carrier in photochemical reduction. *Biochim. Biophys. Acta* 14, 303-311
- 115) Michalski, W.P., Nicholas, D.J.D. (1985) Molecular characterization of a copper-containing nitrite reductase from *Rhodospseudomonas sphaeroides* forma sp. *denitrificans*. *Biochim. Biophys. Acta* 828, 130-137
- 116) Mifflin, B.J. (1972) The role of light in nitrite reduction; studies with leaf discs. *Planta* 105, 225-233
- 117) Mifflin, B.J., Lea, P.J. (1976) The pathway of nitrogen assimilation in plants. *Phytochemistry* 15, 873-885
- 118) Mifflin, B.J., Lea, P.J. (1980) Ammonia assimilation. in: *The Biochemistry of Plants*, Band 5, Hrg. P.K. Stumpf, E.E. Conn. Academic Press, New York; S. 169-199
- 119) Mills, D., Lips, H.S. (1984) Nitrate reduction and compartmentation in tomato leaves. I. Nitrite accumulation in leaf sections in aqueous and gaseous medium. *Physiol. Plant.* 61, 141-148
- 120) Mills, D., Soares, I.M.M., Cresswell, C.F., Lips, H.S. (1984) Nitrate reduction and compartmentation in tomato leaves. II. Nitrate loss by leaf sections in a gaseous atmosphere and the size of the metabolic nitrate pool. *Physiol. Plant.* 61, 149-154
- 121) Miyachi, S., Tamiya, H. (1961) Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells. *Plant Cell Physiol.* 2, 405-414

- 122) Morris, I., Syrett, P.J. (1963) The development of nitrate reductase in *Chlorella* and its repression by ammonium. Arch. Mikrobiol. 47, 32-41
- 123) Mortenson, L.E. (1963) Nitrogen Fixation: role of ferredoxin in anaerobic metabolism. Ann. Rev. Microbiol. 17, 115-138
- 124) Mulvaney, C.S., Hageman, R.H. (1984) Acetaldehyde oxime, a product formed during the in vivo nitrate reductase assay of soybean leaves. Plant Physiol. 76, 118-124
- 125) Naik, M.S., Nicholas, D.J.D. (1986) Malate metabolism and its relation to nitrate assimilation in plants. Phytochemistry 25, 571-576
- 126) Nicholas, D.J.D., Nason, A. (1957) Determination of nitrate and nitrite. Meth. Enzymol. 3, 983-984
- 127) Orebamjo, T.O., Stewart, G.R. (1975) Ammonium inactivation of nitrate reductase in *Lemna minor* L.. Planta 122, 37-44
- 128) Paneque, A., Ramirez, J.M., del Campo, F.F., Losada, M. (1964) Light and dark reduction of nitrite in a reconstituted enzymic system. J. Biol. Chem. 239, 1737-1741
- 129) Peuke, A.D., Tischner, R., Lorenzen, H. (1986) Density-shifts of membranous organelles in synchronous *Chlorella sorokiniana* dependent on nitrogen starvation. J. Plant Physiol. 123, 339-348
- 130) Pistorius, E.K., Funkhouser, E.A., Voss, H. (1978) Effect of ammonium and ferricyanide on nitrate utilization by *Chlorella vulgaris*. Planta 141, 279-282

- 131) Plaut, Z., Lendzian, K., Bassham, J.A. (1977) Nitrite reduction in reconstituted and whole spinach chloroplasts during carbon dioxide reduction. *Plant Physiol.* 59, 184-188
- 132) Purczeld, P., Chon, C.J., Portis, A.R. Jr., Heldt, H.W., Heber, U. (1978) The mechanism of the control of carbon fixation by the pH in the chloroplast stroma. Studies with nitrite-mediated proton transfer across the envelope. *Biochim. Biophys. Acta* 501, 488-498
- 133) Rajasekhar, V.K., Mohr, H. (1986) Appearance of nitrite reductase in cotyledons of the mustard (*Sinapis alba* L.) seedling as affected by nitrate, phytochrome and photooxidative damage of plastids. *Planta* 168, 369-376
- 134) Rajasekhar, V.K., Mohr, H. (1986) Effect of ammonium and nitrate on growth and appearance of nitrate reductase and nitrite reductase in dark- and light-grown mustard seedlings. *Planta* 169, 594-599
- 135) Ramirez, J.M., del Campo, F.F., Paneque, A., Losada, M. (1966) Ferredoxin-nitrite reductase from spinach. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 58-71
- 136) Rao, L.V.M., Datta, N., Mahadevan, M., Guha-Mukherjee, S., Sopory, S.K. (1984) Influence of cytokinins and phytochrome on nitrate reductase activity in etiolated leaves of maize. *Phytochemistry* 23, 1875-1879
- 137) Raven, J.A. (1976) Transport in algal cells. in: *Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Band 2: Transport in Plants II*, Hrg. U. Lüttge, M.G. Pitman. Springer Berlin, Heidelberg, New York; S. 129-188

- 138) Reuveny, Z., Dougall, D.K., Trinity, P.M. (1980) Regulatory coupling of nitrate and sulfate assimilation pathways in cultured tobacco cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 6670-6672
- 139) Rhodes, D., Rendon, G.A., Stewart, G.R. (1975) The control of Glutamine synthetase level in *Lemna minor* L..
Planta 125, 201-211
- 140) Rhodes, D., Stewart, G.R. (1974) A procedure for the in vivo determination of enzyme activity in higher plant tissue. Planta 118, 133-144
- 141) Rigano, C., di Martino Rigano, V., Vona, V., Fuggi, A. (1979) Glutamine synthetase activity, ammonia assimilation and control of nitrate reduction in the unicellular red alga *Cyanidium caldarium*. Arch. Microbiol. 121, 117-120
- 142) Ritenour, G.L., Joy, K.W., Bunning, J., Hageman, R.H. (1967) Intracellular localization of nitrate reductase, nitrite reductase and glutamic acid dehydrogenase in green leaf tissue. Plant Physiol. 42, 233-237
- 143) Robinson, J.M. (1986) Carbon dioxide and nitrite photo-assimilatory processes do not intercompete for reducing equivalents in spinach and soybean leaf chloroplasts.
Plant Physiol. 80, 676-684
- 144) Romero, L.C., Galván, F., Vega, J.M. (1987) Purification and properties of the siroheme-containing ferredoxin-nitrite reductase from *Chlamydomonas reinhardtii*.
Biochim. Biophys. Acta 914, 55-63
- 145) Sanchez Maeso, E., Fernandez Piñas, F., Garcia Gonzalez, M., Fernandez Valiente, E. (1987) Sodium requirement for photosynthesis and its relationship with dinitrogen fixation and the external CO₂ concentration in cyanobacteria.
Plant Physiol. 85, 585-587

- 146) Sawada, E., Satoh, T. (1980) Periplasmic location of dissimilatory nitrate and nitrite reductases in a denitrifying phototrophic bacterium *Rhodospseudomonas sphaeroides* f. sp. *denitrificans*. *Plant Cell Physiol.* 21, 205-210
- 147) Sawhney, S.K., Naik, M.S. (1972) Role of light in the synthesis of nitrate reductase and nitrite reductase in rice seedlings. *Biochem. J.* 130, 475-485
- 148) Sawhney, S.K., Naik, M.S., Nicholas, D.J.D. (1978) Regulation of NADH supply for nitrate reduction in green plants via photosynthesis and mitochondrial respiration. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 1209-1216
- 149) Sawhney, S.K., Nicholas, D.J.D. (1975) Nitrite, hydroxylamine and sulphite reductases in wheat leaves. *Phytochemistry* 14, 1499-1503
- 150) Schmidt, A., Erdle, I., Gamon, B. (1984) Isolation and characterization of thiosulfate reductases from the green alga *Chlorella fusca*. *Planta* 162, 243-249
- 151) Sharma, A.K., Sopory, S.K. (1987) Effect of phytochrome and kinetin on nitrite reductase activity in *Zea mays*. *Plant Cell Physiol.* 28, 447-454
- 152) Sherman, T.D., Erwin, M.A., Funkhouser, E.A. (1983) Changes in nitrate reductase protein during loss and gain of nitrate reductase activity in *Chlorella vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta* 749, 265-269
- 153) Siegel, L.M. (1965) A direct microdetermination for sulfide. *Anal. Biochem.* 11, 126-132
- 154) Sinclair, J. (1987) Changes in spinach thylakoid activity due to nitrite ions. *Photosynth. Res.* 12, 255-263

- 155) Singh, D.P., Kashyap, A.K. (1986) Nitrite transport in the unicellular cyanobacterium *Anacystis nidulans*. Biochem. Physiol. Pflanzen 181, 623-631
- 156) Soares, M.I.M., Lips, S.H., Cresswell, C.F. (1985) Regulation of nitrate and nitrite reduction in barley leaves. Physiol. Plant. 64, 492-500
- 157) Spiller, H., Böger, P. (1977) Photosynthetic nitrite reduction by dithioerythritol and the effect of nitrite on electron transport in isolated chloroplasts. Photochem. Photobiol. 26, 397-402
- 158) Strotmann, H., Ried, A. (1969) Polarographische Messung der Nitritreduktion von *Chlorella* im monochromatischen Licht. Planta 85, 250-269
- 159) Stulen, I., Lanting, L. (1976) Nitrate reductase and nitrite reductase activity in dark-grown radish seedlings: relation to the supply of NADPH. Physiol. Plant. 37, 139-142
- 160) Syrett, B.J., Flynn, K.J., Molloy, C.J., Dixon, G.K., Peplinska, A.M., Cresswell, R.C. (1986) Effects of nitrogen deprivation on rates of uptake of nitrogenous compounds by the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. New Phytol. 102, 39-44
- 161) Tanner, W., Kandler, O. (1967) Die Abhängigkeit der Adaptation der Glucose-Aufnahme von der oxydativen und der photosynthetischen Phosphorylierung bei *Chlorella vulgaris*. Z. Pflanzenphysiol. 58, 24-32
- 162) Tischner, R. (1976) Zur Induktion der Nitrat- und Nitritreduktase in vollsynchronen *Chlorella*-Kulturen. Planta 132, 285-290

- 163) Tischner, R. (1984) Interaction between chloroplast-cytoplasm vacuoles with respect to the regulation of nitrogen metabolism in *Chlorella*. in: Compartments in Algal Cells and Their Interaction, Hrg. W. Wiessner, D. Robinson, R.C. Starr. Springer, Berlin, Heidelberg; S. 157-163
- 164) Tischner, R., Hüttermann, A. (1978) Light-mediated activation of nitrate reductase in synchronous *Chlorella*. Plant Physiol. 62, 284-286
- 165) Tischner, R., Lorenzen, H. (1979) Activation of the nitrate reducing system in synchronous *Chlorella* 211-8k (high temperature strain). Biochem. Physiol. Pflanzen 174, 99-105
- 166) Tischner, R., Lorenzen, H. (1979) Nitrate uptake and nitrate reduction in synchronous *Chlorella*. Planta 146, 287-292
- 167) Tischner, R., Lorenzen, H. (1980) Changes in the enzyme pattern in synchronous *Chlorella sorokiniana* caused by different nitrogen sources. Z. Pflanzenphysiol. 100, 333-341
- 168) Tischner, R., Schmidt, A. (1982) A thioredoxin-mediated activation of glutamine synthetase and glutamate synthase in synchronous *Chlorella sorokiniana*. Plant Physiol. 70, 113-116
- 169) Tischner, R., Schmidt, A. (1984) Light mediated regulation of nitrate assimilation in *Synechococcus leopoliensis*. Arch. Microbiol. 137, 151-154
- 170) Tsuzuki, M. (1986) Transport and fixation of inorganic carbon in the cells of *Chlorella vulgaris* 11h grown under ordinary air. Plant Cell Physiol. 27, 1233-1240

- 171) Ullrich, W.R. (1974) Die nitrat- und nitritabhängige photosynthetische O₂-Entwicklung in N₂ bei *Ankistrodesmus braunii*. *Planta* 116, 143-152
- 172) Ullrich, W.R. (1979) Die Nitritaufnahme bei Grünalgen und ihre Regulation durch äußere Faktoren. *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 92, 273-284
- 173) Vaughn, K.C., Duke, S.O., Funkhouser, E.A. (1983) Cytochemical and immunocytochemical localization of nitrate reductase. *Plant Physiol.* 72 (Suppl.), 130
- 174) Vaughn, K.C., Duke, S.O., Funkhouser, E.A. (1984) Immunochemical characterization and localization of nitrate reductase in norflurazon-treated soybean-cotyledons. *Physiol. Plant.* 62, 481-484
- 175) Vega, J.M., Cárdenas, J., Losada, M. (1980) Ferredoxin-nitrite reductase. *Meth. Enzymol.* 69, 255-270
- 176) Vennesland, B., Guerrero, M.G. (1979) Reduction of nitrate and nitrite. in: *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, Band 6: Photosynthesis II, Hrg. M. Gibbs, E. Latzko. Springer Berlin, Heidelberg, New York; S. 425-444
- 177) Vernon, L.P. (1959) Photochemical oxidation and reduction reactions catalyzed by flavin nucleotides. *Biochim. Biophys. Acta* 36, 177-185
- 178) Watt, M.P., Gray, V.M., Cresswell, C.F. (1987) Control of nitrate and nitrite assimilation by carbohydrate reserves, adenosine nucleotides and pyridine nucleotides in leaves of *Zea mays* L. under dark conditions. *Planta* 172, 548-554
- 179) Weathers, P.J. (1984) N₂O evolution by green algae. *Appl. Environ. Microbiol.* 48, 1251-1253

- 180) Weathers, P.J., Niedzielski, J.J. (1986) Nitrous oxide production by cyanobacteria. Arch. Microbiol. 146, 204-206
- 181) Yokota, A., Canvin, D.T. (1986) Changes of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase content, ribulose biphosphate concentration, and photosynthetic activity during adaptation of high-CO₂ grown cells to low-CO₂ conditions in *Chlorella pyrenoidosa*. Plant Physiol. 80, 341-345
- 182) Zumft, W.G. (1972) Ferredoxin:nitrite oxidoreductase from *Chlorella*. Purification and properties. Biochim. Biophys. Acta 276, 363-375
- 183) Zumft, W.G., Gotzmann, D.J., Kroneck, P.M.H. (1987) Type 1, blue copper proteins constitute a respiratory nitrite-reducing system in *Pseudomonas aureofaciens*. Eur. J. Biochem. 168, 301-307

Die vorliegende Arbeit wurde am Botanischen Institut der Universität München unter Leitung von Prof. Dr. A. Schmidt angefertigt.

Herrn Prof. Dr. A. Schmidt danke ich vielmals für seine Unterstützung, für hilfreiche Ratschläge und vor allem für die vielen anregenden und kritischen Diskussionen.

Bei K. Felkl bedanke ich mich herzlich für ihre sorgfältige, geduldige Hilfe bei der Durchführung der Wachstumsversuche und für sonstige freundschaftliche Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Tischner (Pflanzenphysiologisches Institut der Universität Göttingen) danke ich für sein Interesse an dieser Arbeit, für die Durchführung der Dichtezentrifugationen und weiterführender Versuche und für anregende Diskussionen.

Bei Dr. J. Soll (Botanisches Institut der Universität München) möchte ich mich dafür bedanken, daß er mir Präparationen aufgetrennter Envelope-Membranen überlassen hat.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. H. Rennenberg (Fraunhofer-Institut, Garmisch-Partenkirchen) für die Durchführung der Stickoxid-Bestimmungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitgliedern des Arbeitskreises bedanken, die zum angenehmen Arbeitsklima beigetragen haben.

Schließlich danke ich der Studienstiftung des deutschen Volkes für die ideelle und für die finanzielle Förderung, die mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Lebenslauf

6.3.1960	Geburt in Hamburg
1966	Grundschule in Hamburg-Sasel
1966-1969	Grundschule in Lich/Oberhessen
1969-1972	Landgraf-Ludwigs-Gymnasium in Gießen (humanistisches Gymnasium)
1972-1978	Pestalozzi-Gymnasium in München (musisches Gymnasium)
1978	Abitur Beginn des Studiums an der Ludwig-Maximilians-Universität in München (Biologie/Chemie für das Lehramt an Gymnasien)
1980	Diplom-Vorprüfung
1982-1983	Diplomarbeit bei Prof. Dr. A. Schmidt
1984	Diplom-Hauptprüfung Erste Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien in Biologie und Chemie Beginn der Dissertation

